

Université de Montréal

**Implication de l'apoptose des cellules endothéliales dans la libération  
de nouveau(x) médiateur(s) soluble(s) actif(s) sur le  
microenvironnement vasculaire**

Par

Marc-André Raymond

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Moléculaire

Mars, 2004

© Marc-André Raymond, 2004



QH

506

U54

2004

v.008

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Implication de l'apoptose des cellules endothéliales dans la libération  
de nouveau(x) médiateur(s) soluble(s) actif(s) sur le  
microenvironnement vasculaire**

Présenté par :

Marc-André Raymond

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président rapporteur

Marie-Josée Hébert, directeur de recherche

Alain Rivard, membre du jury

---

Richard Larivière, examinateur externe

## RÉSUMÉ

L'insulte endothéliale est un événement initial dans la physiopathologie de maladies vasculaires, telles l'athérosclérose et les microangiopathies thrombotiques (MT). Une augmentation de la mort cellulaire endothéliale caractérise la phase précoce de ces conditions. La phase chronique est associée à un phénomène de réparation vasculaire continué caractérisé par une accumulation de cellules musculaires lisses (CML). La relation entre l'apoptose endothéliale et les phénomènes de réparation vasculaire était, au moment où nous avons débuté nos travaux, mal définie. Nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose endothéliale initie la production de facteurs favorisant la réparation vasculaire. Nos buts ont été de définir les conséquences de l'inhibition de l'apoptose endothéliale sur l'insulte endothéliale et de caractériser la réponse paracrine activée par l'apoptose endothéliale.

Nous avons d'abord inhibé l'apoptose des cellules endothéliales (CE) avec la cyclosporine A (CsA), un agent immunosuppresseur et un inhibiteur de la cyclophiline D qui bloque la relâche de cytochrome C. L'inhibition de l'apoptose des CE par la CsA réoriente le développement de la mort cellulaire vers une forme de mort cellulaire programmée (MCP) nécrotique. La MCP nécrotique est dépendante de la production d'anions superoxydes et de l'activation subséquente de la cathepsine D. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'apoptose des CE favorise le développement d'une mort nécrotique potentiellement plus néfaste pour l'homéostasie vasculaire. Ces résultats pourraient expliquer le risque accru de MT chez l'humain en association avec la CsA.

Nous avons ensuite déterminé si l'apoptose des CE active la libération de médiateur(s) soluble(s) ayant une activité réparatrice. Nous avons démontré que l'apoptose des CE permet la relâche de facteurs solubles ayant une activité anti-apoptotique, pro-proliférative et pro-angiogénique sur les CE. L'activité anti-apoptotique autocrine passe par une activation des PKC, une augmentation de Bcl-2 et une diminution de Bax chez les CE.

Nous avons ensuite démontré que les facteurs solubles relâchés par les CE apoptotiques ont une activité anti-apoptotique et pro-proliférative sur les CML. L'activité anti-apoptotique paracrine passe par une activation de ERK 1/2, une induction de Bcl-xl et une diminution de p53 chez les CML. Nous avons déterminé par spectrométrie de masse qu'un fragment C-terminal du domaine V du perlécan est relâchée par les CE apoptotiques. Un peptide synthétique homologue à ce fragment et la sulfate de chondroïtine, qui est ancrée sur ce fragment de perlécan, induisent une réponse anti-apoptotique chez les CML par l'activation ERK 1/2 et l'induction de Bcl-xl.

Nos résultats suggèrent donc que l'apoptose des CE initie des voies de réparation vasculaire dans l'environnement local. Lors du processus normal de réparation, les facteurs solubles favoriseraient la réendothélisation et le remodelage normal de la paroi vasculaire, mais suite à une augmentation chronique de l'apoptose endothéliale, une exposition chronique aux facteurs de réparation stimulerait le remodelage vasculaire pathologique.

**Mots-clés :** Cellules endothéliales, cellules vasculaires musculaires lisses, remodelage vasculaire, épaissement myo-intimal, préconditionnement, perlécan, mort cellulaire programmée, chondroïtine sulfate, Bcl-2, ERK 1/2.

## ABSTRACT

Endothelial injury is an initial event in the pathophysiology of vascular diseases, such as atherosclerosis and thrombotic microangiopathy (TM). In these conditions, an increase in endothelial cell death characterizes the initial phase. The chronic phase is associated with continuous vascular repair characterized by accumulation of vascular smooth muscle cells (VSCM). The relationship between endothelial apoptosis and initiation of vascular repair was, at the moment we started our work, poorly defined. We formulated the hypothesis that endothelial apoptosis initiates the production of factors favouring vascular repair. Our goals were to define the consequences of apoptosis inhibition on an endothelial insult and to characterize the paracrine response activated by endothelial apoptosis.

We first inhibited apoptosis of endothelial cells (EC) with cyclosporin A (CsA), an immunosuppressive agent that blocks the release of cytochrome C. Inhibition of EC apoptosis by CsA redirected the development of cell death toward a form of necrotic programmed cell death (PCD). Necrotic PCD was found to be dependent on the production of superoxyde anions and the subsequent activation of cathepsin D. These results suggest that inhibition of EC apoptosis favours the development of a necrotic form of PCD potentially more harmful for vascular homeostasis. These results could explain the increased risk of TM associated with CsA in human.

We then determined whether apoptosis of EC activates the release of soluble(s) mediator(s) that would in turn initiate endothelial repair. We demonstrated that apoptosis of EC triggers the release of soluble factors with anti-apoptotic, pro-

proliferative and pro-angiogenic activities on EC. Activation of PKC, increased Bcl-2 and decreased Bax protein levels in EC mediate this anti-apoptotic activity.

We then demonstrated that the soluble factors released by apoptotic EC have anti-apoptotic and pro-proliferative activities on VSMC. Activation of ERK 1/2, induction of Bcl-xl and downregulation of p53 at the gene and protein levels in VSMC mediate resistance to apoptosis. We determined, using mass spectrometry, that a C-terminal fragment of the domain V of perlecan is released by apoptotic EC. A synthetic peptide homologous to this fragment and chondroitin sulfate, which is anchored on this fragment, induced an anti-apoptotic response in VSMC through activation of ERK 1/2 and induction of Bcl-xl.

Thus, our results suggest that apoptosis of EC initiates vascular repair pathways within the local environment. During normal repair, these soluble factors would favour reendothelisation and normal remodelling of the vascular wall. However, a chronic increase in endothelial apoptosis would result in chronic exposure to these factors and foster a pathologic form of vascular remodelling.

**Key words:** Endothelial cells, vascular smooth muscles cells, vascular remodelling, myo-intimal thickening, preconditioning, perlecan, programmed cell death, chondroitine sulfate, Bcl-2, ERK 1/2.



**TABLE DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLES</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>XIII</b>
<b>DÉDICACE</b>	<b>XVIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La mort cellulaire</b>	<b>3</b>
1.1.1 La nécrose	4
1.1.2 La mort cellulaire programmée	4
1.1.2.1 L'apoptose	5
1.1.2.2 La mort cellulaire programmée non-apoptotique	26
<b>1.2 Système vasculaire</b>	<b>32</b>
1.2.1 Les composantes de la paroi vasculaire	37

1.2.1.1	L'endothélium	37
1.2.1.2	La membrane basale	39
1.2.1.3	Les cellules vasculaires musculaires lisses	45
1.2.2	L'angiogénèse	50
1.2.3	L'hémostase et la coagulation	53
1.2.4	Les maladies associées à une dysfonction de l'endothélium	55
1.2.4.1	L'athérosclérose	55
1.2.4.2	Microangiopathie thrombotique	61
1.2.5	La cyclosporine A	64
1.2.6	Le préconditionnement	67
<b>2.</b>	<b>OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES</b>	<b>70</b>
2.1	Prémises	71
2.2	Hypothèses	73
2.3	Objectifs	74
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b>	<b>76</b>
3.1	<b>ARTICLE NO. 1</b>	
	Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporine A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells : regulation by reactive oxygen species and cathepsin D	77
3.2	<b>ARTICLE NO. 2</b>	
	Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells	117

**3.3 ARTICLE NO. 3**

Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells 156

<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>200</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>225</b>
<b>6</b>	<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>232</b>

## **LISTE DES TABLES**

### **RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

#### **3.2 ARTICLE NO. 2**

##### **Table I**

Inhibition of adenosine, opioid and endothelin receptors and inhibition of nitric oxide synthase do not block the cytoprotective activity of conditioned medium 153

##### **Table II**

Effect of neutralizing antibodies for various growth factors and cytokines on the cytoprotective activity of SSC 154

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

<b>Figure 1.</b> Schéma de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie	15
<b>Figure 2.</b> Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose	19
<b>Figure 3.</b> Schéma de la voie extrinsèque de l'apoptose	23
<b>Figure 4.</b> Schéma des mécanismes impliqués dans les différentes formes de mort cellulaires programmées	30
<b>Figure 5.</b> Représentation de la structure des artères et des veines	35
<b>Figure 6.</b> Représentation de la structure du perlécan	43

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

#### 3.1 ARTICLE NO. 1

<b>Figure 1.</b> Cyclosporin A protects against apoptosis, but enhances necrosis of HUAEC.	108
<b>Figure 2.</b> Cyclosporin A does not activate p53 and caspases in HUAEC.	110
<b>Figure 3.</b> Role of calcineurin inhibition and permeability transition inhibition on CsA-induced cell death.	112
<b>Figure 4.</b> Detection of cyclosporin A-induced peroxynitrite and NO formation in HUAEC.	114

<b>Figure 5.</b> Cyclosporin A-induced superoxide formation and lysosomal damage in HUAEC.	116
<b>3.2 ARTICLE NO. 2</b>	
<b>Figure 1.</b>	146
<b>Figure 2.</b>	148
<b>Figure 3.</b>	150
<b>Figure 4.</b>	152
<b>3.3 ARTICLE NO. 3</b>	
<b>Figure 1.</b>	191
<b>Figure 2.</b>	194
<b>Figure 3.</b>	196
<b>Figure 4.</b>	198
<b>DISCUSSION</b>	
<b>Figure 1.</b> Schéma de l'effet de l'apoptose endothéliale sur l'environnement vasculaire	223
<b>CONCLUSION</b>	
<b>Figure 1.</b> Schéma de la réparation des vaisseaux : l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire.	230

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.A.	:	Acide aminé
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADP	:	Adénosine diphosphate
AIF	:	Facteur d'initiation de l'apoptose
Ang-1	:	Angiopoétine 1
Ang-2	:	Angiopoétine 2
ANT	:	Protéine de translocation de nucléotide adénine
Apaf-1	:	Facteur activateur des protéases de l'apoptose 1
apoE	:	Apolipoprotéine E
ATM	:	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	:	Adénosine triphosphate
ATR	:	Ataxia telangiectasia related
bFGF	:	Facteur de croissance fibroblastique de base
BIR	:	Répétition de baculovirus
CAD	:	DNase activée par les caspases
cAMP	:	Adénosine monophosphate cyclique
CARD	:	Domaine de recrutement associé aux caspases
Caspases	:	Protéases cystéinyl aspartate spécifiques
CDK2	:	Cycline kinase dépendante 2
CE	:	Cellules endothéliales
CEA	:	Cellules endothéliales artérielles

Chk1	:	Kinase de point de contrôle 1
Chk2	:	Kinase de point de contrôle 2
CML	:	Cellules vasculaires musculaires lisses
cPLA2	:	Phospholipase cytosolique A2
CsA	:	Cyclosporine A
cyt C	:	Cytochrome C
DD	:	Domaine de mort cellulaire
DED	:	Domaine effecteur de mort cellulaire
Diablo	:	Protéine d'attachement directe aux IAP
DNA-PK	:	Protéine kinase dépendante de l'ADN
EGF	:	Facteur de croissance épithéliale
endoG	:	Endonucléase G
ERK	:	Kinase de réponse aux signaux extracellulaires
FADD	:	Protéine associée au Fas avec un domaine DD
FasL	:	Ligand de Fas
FGF	:	Facteur de croissance fibroblastique
FPLC	:	Chromatographie liquide à forte pression
Gel 2-D	:	Gel en deux dimensions
HIF	:	Facteur de transcription inducible par l'hypoxie
HUVEC	:	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
IAP	:	Protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAD	:	Inhibiteur de la DNase activée par les caspases
ICAM-1	:	Molécules d'adhésion intercellulaire 1
IGF-1	:	Facteur de croissance semblable à l'insuline-1



IgG	:	Immunoglobuline
INOS	:	Synthase d'oxyde nitrique inductible
JNK	:	Kinase c-Jun N-terminale
kD	:	Kilo daltons
LDL	:	Lipoprotéines de basses densités
MAPK	:	Protéines kinase activées par les mitogènes
MB	:	Membrane basale
MCP	:	Mort cellulaire programmée
MDM2	:	Mouse double minute 2
MMC	:	Mitomycine C
MnSOD	:	Superoxyde dismutase mitochondriale
MT	:	Microangiopathie thrombotique
NFAT	:	Facteur nucléaire des cellules T activées
NF- $\kappa$ B	:	Facteur nucléaire $\kappa$ B
NO	:	Oxyde nitrique
NOS	:	Synthase d'oxyde nitrique
oxLDL	:	Lipoprotéines de basses densités oxydées
p38	:	MAPK p38
PAI-1	:	Inhibiteur de l'activateur plasminogène type 1
PAK2	:	Kinase p21-activée 2
PDGF	:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR- $\beta$	:	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes $\beta$
PGI <sub>2</sub>	:	Prostacycline
PKC	:	Protéine kinase C

PMM	:	Perméabilisation de la membrane mitochondriale
PP2B	:	Protéine phosphatase de type 2B
PPIase	:	Peptidyle-proline-cis-trans isomérase
PTP	:	Pore de transition de la perméabilité membranaire
RING	:	Domaine structurel des IAP avec une activité ligase d'ubiquitination E3
RNS	:	Espèces réactives de nitrogènes
ROS	:	Espèces réactives d'oxygènes
SEA	:	Sperme, entérokinase, agrine
SM	:	Spectrométrie de masse
Smac	:	Second activateur mitochondriale des caspases
SSC	:	Sans sérum conditionné par des CE en condition pro- apoptotique
TCR	:	Récepteur des cellules T
TF	:	Facteur tissulaire
TGF- $\beta$	:	Facteur de croissance transformant $\beta$
Tiron	:	4,5-dihydrobenzène 1,3-disulfonate
TNF- $\alpha$	:	Facteur de nécrose de tumeur $\alpha$
t-PA	:	Activateur tissulaire du plasminogène
TRADD	:	Protéine associée au récepteur du TNF avec un domaine DD
u-PA	:	Activateur urinaire du plasminogène
VCAM-1	:	Molécules d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VDAC	:	Canaux anioniques voltage dépendant

- VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire
- XIAF-1 : Facteur-1 associé à XIAP
- ZVAD-FMK : Inhibiteur pan-caspases

À la mémoire de ma mère.

Pour tes encouragements, tes conseils, ton  
exemple de travail, de détermination et de vie.

Merci maman pour ton support.

Je me souviendrais toujours de toi.

Avec amour.

Ton fils.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu ma directrice de recherche, Dr Marie-Josée Hébert. En tant que directrice de recherche, elle possède un esprit ouvert à la discussion et aux nouvelles idées, ainsi qu'un enthousiasme communicatif pour la recherche, qu'elle sait faire partager aux autres. Elle sait aussi comment exiger ce qu'il y a de mieux chez un étudiant, même quand il ne sait plus comment faire. Elle est la meilleure directrice de recherche qu'un étudiant peut chercher. Comme personne, elle est généreuse et sensible. Elle sait être présente et nous supporter dans les situations difficiles. Pour toutes ces raisons et d'autres, je lui dis merci beaucoup.

Je voudrais aussi remercier le Dr Richard Bertrand. Si lui ne se souvient pas pourquoi, moi je me souviens d'une fin d'après-midi un vendredi soir de novembre 1999. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter à ce moment et d'avoir répondu à mes questions. Cette discussion m'a permis de réaliser ce travail.

À ma famille et mes amis, je leur dis merci pour leur patience. J'ai souvent été de longue période sans donner de nouvelles et ils ont toujours su être présents quand je ressortais de l'ombre. Je les remercie aussi pour leurs encouragements dans les périodes difficiles. Je tiens à remercier Alexandre, qui a toujours été présent dans les hauts et les bas. Merci Alex pour le dîner à l'automne 1999, merci de m'avoir écouté à ce moment. Je voudrais dire merci à ma grand-mère Aurore, pour le support dont elle a su faire preuve depuis bien des années. Merci grand-maman, car comme je te

l'ai déjà dit : Sans toi, je ne serais pas rendu ici aujourd'hui. Merci aussi à ma copine Isabelle, qui sait être patiente avec moi, parce que je ne suis pas vraiment toujours présent mentalement.

Finalement, bien que je lui dédicace ce travail, je tiens à dire merci à ma mère pour son support et son amour. Bien que tu n'y sois plus, je te dis merci avec amour.

# **1 INTRODUCTION**

L'organisme est formé de plusieurs milliers de cellules différenciées qui se sont spécialisées. Cependant, la spécialisation cellulaire occasionne une dépendance à l'ensemble. Ainsi, elles sont plus sensibles aux variations de leur environnement, comme la température, le pH et les substances chimiques. Elles ne peuvent pas non plus se déplacer pour aller chercher les nutriments ou pour fuir les déchets qu'elles libèrent. Elles sont donc dépendantes de l'ensemble pour leur fournir les nutriments, l'oxygène et les hormones nécessaires à leur fonctionnement et pour retirer les déchets produits qui leur sont nuisibles. L'organisme a donc développé un système de canalisation qui permet d'acheminer les nutriments aux cellules et de retirer les déchets pour les diriger vers les organes d'élimination. Ce système est composé du système vasculaire, qui est composé d'artères pour le transport des nutriments, de veines pour le transport des déchets et de sang, qui sert de véhicule, et du système lymphatique, qui permet le drainage du liquide présent autour des cellules des tissus et son retour vers les veines.

La paroi des vaisseaux du système vasculaire est composée de trois différents types cellulaires, soit les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Chacun de ces types cellulaires jouent un rôle important dans le fonctionnement et le maintien de l'homéostasie vasculaire. Cependant, les cellules n'étant pas éternelles, un équilibre devient nécessaire entre la mort cellulaire et la prolifération afin de maintenir l'homéostasie de l'ensemble. Nous savons que la prolifération et la mort cellulaire sont deux mécanismes opposés nécessaires à la fois pour le développement embryonnaire et pour le maintien de l'organisme [1, 2]. Une



altération de l'un de ces processus peut avoir de graves conséquences biologiques dans l'organisme. Cela est particulièrement important au niveau du système vasculaire. En effet, le système vasculaire permet l'apport de nutriments et l'élimination des déchets, alors qu'une interruption de son fonctionnement met immédiatement en péril le bon fonctionnement de l'organisme. Une bonne compréhension des processus de mort cellulaire au niveau du système vasculaire est donc primordiale, afin de prévenir des complications vasculaires ou de les guérir.

## **1.1 La mort cellulaire**

La mort et la prolifération cellulaire sont le ying et le yang du développement embryonnaire et du maintien de l'organisme. Elles sont deux opposées, qui permettent le maintien, de l'équilibre de l'organisme. L'homéostasie entre les deux est très importante, puisqu'une dérégulation peut entraîner de graves altérations biologiques [3]. Ainsi, une déficience en mort cellulaire entraîne le développement de cancer [4, 5] et de maladie auto-immune [6-9], alors qu'une trop forte augmentation de la mort cellulaire est à l'origine du développement de plusieurs maladies [10]. Il devient donc important de comprendre les différents processus de mort cellulaire et leurs implications au niveau de l'organisme. En fait, il existe deux grands archétypes de mort cellulaire : la mort cellulaire accidentelle (nécrose), et la mort cellulaire programmée, dont la forme la plus connue est l'apoptose [11].

### **1.1.1 La nécrose**

La nécrose est une forme de mort cellulaire qui est accidentelle [12]. Elle n'est pas contrôlée génétiquement et elle ne peut être inhibée à moins de retirer le stimulus de départ [12]. Elle se caractérise principalement du point de vue morphologique par un gonflement du volume cellulaire, des organelles et du noyau [12, 13]. Pendant le processus de mort cellulaire nécrotique, la membrane de la cellule nécrotique perd sa perméabilité. Finalement, la cellule finit par lyser sa paroi cellulaire et relâcher tout son contenu intracellulaire dans l'environnement extérieur [13]. Les changements morphologiques sont le résultat de perturbation de l'homéostasie intracellulaire suite à des changements qui incluent une diminution de la production d'adénosine triphosphates (ATP) et une perte de l'homéostasie ionique (calcium, potassium et sodium) [12]. La nécrose n'est pas une forme de mort cellulaire silencieuse, puisque la nécrose produit une réaction pro-inflammatoire permettant l'élimination des cellules nécrotiques [10, 11]. Typiquement, la nécrose entraîne une atteinte des cellules environnantes, provoque le recrutement de leucocytes polymorphonucléaires, principalement des neutrophiles, et le développement de l'inflammation [14].

### **1.1.2 La mort cellulaire programmée**

La mort cellulaire programmée (MCP) est essentielle pour le maintien et le développement d'organismes multicellulaires. Les cellules endommagées, non

nécessaires ou potentiellement dangereuses doivent être éliminées de façon à conserver la structure et la fonction des tissus [15]. La MCP est régulée génétiquement et peut être arrêtée par l'inhibition du processus de mort cellulaire. La principale forme de MCP est l'apoptose, bien qu'il existe aussi des formes de MCP non-apoptotique [16, 17]. La MCP apoptotique est généralement considérée comme une forme de mort cellulaire silencieuse en ce sens que la MCP permet un retrait des cellules sans réaction inflammatoire, ce qui limite les dommages dans l'environnement local [11].

#### **1.1.2.1 L'apoptose**

L'apoptose est un processus qui est régulé génétiquement et qui mène à la mort cellulaire et à la phagocytose des corps apoptotiques [18, 19]. L'apoptose peut être divisée en trois phases : l'engagement, dans lequel la cellule, ayant reçu un stimulus apoptotique létal, devient commise à la mort ; l'exécution, où la majeure partie des changements morphologiques surviennent ; et l'élimination, où les restes cellulaires sont éliminés par phagocytose. Les changements structuraux, qui surviennent durant la phase d'exécution, ont été décrits pour la première fois par Kerr et al. en 1972 [2]. Nous commençons maintenant à mieux comprendre ces changements d'un point de vue mécanistique. Durant la phase d'exécution, des changements morphologiques et biochimiques surviennent au niveau du noyau, du cytoplasme, des organelles et de la membrane cytoplasmique. On observe une diminution du volume cytoplasmique cellulaire [2]. Une condensation et une

agrégation de la chromatine s'observent à la périphérie du noyau [2] et on peut aussi constater une fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [14]. La formation d'un bourgeonnement à la paroi cellulaire mène à la formation de corps apoptotique [2, 12]. La membrane de la cellule conserve son intégrité membranaire, mais se caractérise par la redistribution des phospholipides membranaires et l'externalisation de phosphatidylsérine, un phospholipide membranaire qui est normalement conservé à la surface interne de la membrane cellulaire [20-22]. Finalement, les corps apoptotiques seront phagocytés par les cellules avoisinantes [18, 19]. En fait, l'apoptose, à la différence de la nécrose, est généralement considérée comme une forme de mort cellulaire silencieuse. L'apoptose permet un retrait des corps apoptotiques sans réaction inflammatoire. Les corps apoptotiques sont phagocytés principalement par les cellules environnantes et par des leucocytes mononucléés, comme des monocytes/macrophages [14].

L'apoptose est associée à l'activation de caspases qui cliveront des substrats impliqués dans : la réparation de l'ADN, l'assemblage nucléaire et l'intégrité du cytosquelette [19]. Durant l'apoptose, le processus de mort cellulaire est régulé génétiquement par différentes protéines : comme les caspases, les protéines de la famille Bcl-2 et différentes autres protéines [19]. L'apoptose peut être initiée par deux voies principales : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque [19]. Le stress génotoxique, la carence en facteur de croissance et l'hypoxie sont des activateurs classiques de la voie intrinsèque ou mitochondriale, alors que les signaux externes transmis par l'activation de récepteurs membranaires activent la voie extrinsèque [19].

### 1.1.2.1.1 Les caspases

La majorité des changements observés dans la cellule lors de l'apoptose sont causés par des cystéines protéases activées principalement lors de l'apoptose [19]. Les protéases de la mort sont homologues entre elles et font partie d'une grande famille de protéases appelée caspases [23]. Elles se retrouvent de l'homme aux nématodes en passant par les insectes [24-26]. Les caspases ont pour fonction de détruire les composantes internes de la cellule. Elles possèdent toutes un site actif cystéine et coupent leurs substrats après un acide aspartique. C'est la séquence de quatre acides aminés qui suit l'acide aspartique qui détermine la spécificité de substrat des caspases [27]. L'identification de plusieurs substrats des caspases permet de comprendre certaines caractéristiques de l'apoptose [19]. Un des substrats des caspases est l'inhibiteur de la DNase activée par les caspases (ICAD), qui est responsable de la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN [28-32]. L'activation constitutive de la kinase p21-activée 2 (PAK2) par les caspases s'effectue par le clivage de la sous unité régulatrice de la sous unité catalytique et cette activation semble être responsable du bourgeonnement membranaire observé durant l'apoptose [33]. Le clivage des lamines nucléaires par les caspases semble lui aussi être requis pour le bourgeonnement et le rétrécissement nucléaire [34, 35]. Le clivage des protéines du cytosquelette, comme la fodrine et la gelsoline, cause probablement la perte de la forme générale de la cellule [36]. Près d'une centaine de substrats additionnels des caspases ont été identifiés au cours des années [24, 37]. Il en reste

certainement plus encore à identifier, puisque le processus de l'apoptose est très complexe et que l'on commence seulement à en percevoir les ramifications. Il y a aussi plusieurs processus apoptotiques qui doivent être mieux caractérisés, comme les signaux de phagocytose des corps apoptotiques, la communication intercellulaire durant l'apoptose et la diminution du volume cellulaire [18].

Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènes. Les zymogènes sont formés de trois domaines : un pro-domaine N-terminal et des domaines p10 et p20, qui se retrouvent dans la forme mature de l'enzyme [19]. Pour médier leurs activités, les caspases doivent être activées par une protéolyse, soit auto-catalytique, (caspase-9, -8 et -2) ou par une autre caspase (caspase-3, -6 et -7) [19]. Ce clivage permet la libération de la forme active des caspases [19]. Les caspases fonctionnent en hétérotétramère de p10/p20 [24]. Il existe cependant une exception, la caspase-9, qui doit aussi s'associer avec des sous-unités régulatrices en plus d'être clivée. La caspase-9 interagit donc avec Apaf-1, l'ATP et le cytochrome C (cyt C) pour former une enzyme appelée apoptosome [38-41]. On effectue aussi une distinction entre les caspases initiatrices (caspase-9, -8 et -2), qui agissent au début de la cascade apoptotique, et les caspases effectrices (caspase-3, -6, -7), qui elles vont couper les substrats menant à l'apoptose [19].

#### **1.1.2.1.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose**

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) sont des protéines qui, comme leurs noms l'indiquent, servent à bloquer la cascade apoptotique et à prévenir l'apoptose [42, 43]. Il en existe huit identifiés à ce jour : XIAP [44-47], NIAP [48], ILP-2 [49], ML-IAP, cIPA1 [50], cIAP2 [50], survivine [51] et apollon. Elles sont formées de façon variable de deux domaines conservés : soit BIR [52-55] et RING [56]. Le domaine BIR est essentiel à l'activité anti-apoptotique par sa liaison aux caspases pour en inhiber l'activité [57]. Le domaine RING serait lui utile pour l'ubiquitination des IAP [56]. Le niveau de ces protéines est régulé par le facteur transcriptionnel en réponse au stress : NF-kB [58, 59]. Les IAP, comme les caspases, possèdent elles aussi leurs inhibiteurs, sous la forme de protéines mitochondriales appelées Smac/Diablo [60, 61], Omi/HtrA2 [62-66] et le facteur nucléaire associé à XIAP (XAIF-1) [67, 68]. Ces protéines sont relâchées de la mitochondrie en apoptose et viennent restreindre l'inhibition des IAP sur les caspases afin de favoriser l'apoptose [60, 61, 69].

#### **1.1.2.1.3 La famille des Bcl-2**

La protéine Bcl-2 a été clonée et caractérisée à cause de son implication dans la translocation t(14:18) qui est fréquemment retrouvée chez les lymphomes folliculaires de cellules B humaines [70, 71]. La caractéristique principale de Bcl-2 est son habileté à augmenter la survie cellulaire plutôt que de promouvoir la prolifération [72, 73]. La régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 s'effectue par des interactions protéine-protéine [74-76]. La famille comporte une

trentaine de protéines qui sont classées en trois groupes fonctionnels selon leurs similarités structurales et des critères de fonctionnement [74, 75]. Le groupe 1 comprend les membres anti-apoptotiques, comme les Bcl-2 et Bcl-xL. Ils sont composés de quatre domaines conservés d'homologie Bcl-2 (BH1 à BH4) et se retrouvent situés à la surface externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique, du noyau et du cytoplasme. Le groupe 2 comprend les membres pro-apoptotiques, comme les Bax et Bak. Ils sont composés majoritairement des trois premiers domaines d'homologie Bcl-2 (BH1 à BH3) [74, 75]. Finalement, le groupe 3 comprend les membres pro-apoptotiques, comme les Bad, Bik et Bim. Cependant, ils ont seulement le troisième domaine d'homologie Bcl-2 conservé (BH3) en commun [75]. La protéine Bid est plus difficile à classer puisqu'elle contient que le BH3 et partage le même genre de repliement moléculaire que Bcl-xL. La littérature s'entend cependant pour dire que Bid fait partie du groupe 3 [77, 78]. Les membres pro-apoptotiques peuvent se déplacer vers la mitochondrie sur réception d'un signal pro-apoptotique. L'activité des protéines pro-apoptotiques est dépendante de leur dimérisation avec les membres anti-apoptotiques, sur qui ils agissent comme inhibiteurs trans-dominants [19]. Les membres pro- et anti-apoptotiques peuvent former des hétérodimères [74-76], ce qui résulte en une neutralisation mutuelle.

La régulation la plus importante au niveau du signal apoptotique passe par les protéines contenant le motif BH3. Le modèle actuel propose que suite à un stimulus de mort, les protéines avec un BH3 seulement stimulent l'apoptose en interagissant et inhibant les molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL, ou en interagissant avec d'autres protéines de mort, comme Bax et Bak, qui deviennent activées [79]. Les



protéines avec un BH3 seulement qui neutralisent les protéines anti-apoptotiques sont maintenant référées comme protéines BH3 sensibilisatrices, alors que celles qui s'attachent aux pro-apoptotiques Bax et Bak sont appelées protéines BH3 activatrices [79]. La clé de la régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 passe par le niveau d'abondance relative des membres pro- et anti-apoptotiques.

#### **1.1.2.1.4 La voie intrinsèque**

La voie intrinsèque d'initiation de l'apoptose régit les traumatismes cellulaires qui surviennent à l'intérieur de la cellule. Elle surveille le bon état interne de la cellule. Suite à un stress génotoxique qui endommage l'ADN, les bris doubles brins de l'ADN sont détectés par des enzymes de la famille des kinases phosphatidylinositol-3-OH (ATM, ATR et DNA-PK) [80, 81]. ATM, ATR et DNA-PK, ainsi que les kinases Chk1 et Chk2 induites en aval des dommages à l'ADN phosphorylent des résidus sérines à l'intérieur de la région amino terminale de p53 [82]. Cette phosphorylation augmente la fonction de transactivation de p53 et/ou inhibe l'interaction de p53 avec MDM2, prévenant la dégradation de p53 [83, 84]. La protéine p53 inhibe l'expression d'une protéine anti-apoptotique, Bcl-2, et induit l'expression de protéines pro-apoptotiques, comme PUMA [85], NOXA [86] et Bax [83, 84]. Récemment, on a découvert que la protéine p53 activée est impliquée dans l'activation directe de la protéine pro-apoptotique Bax, provoquant la

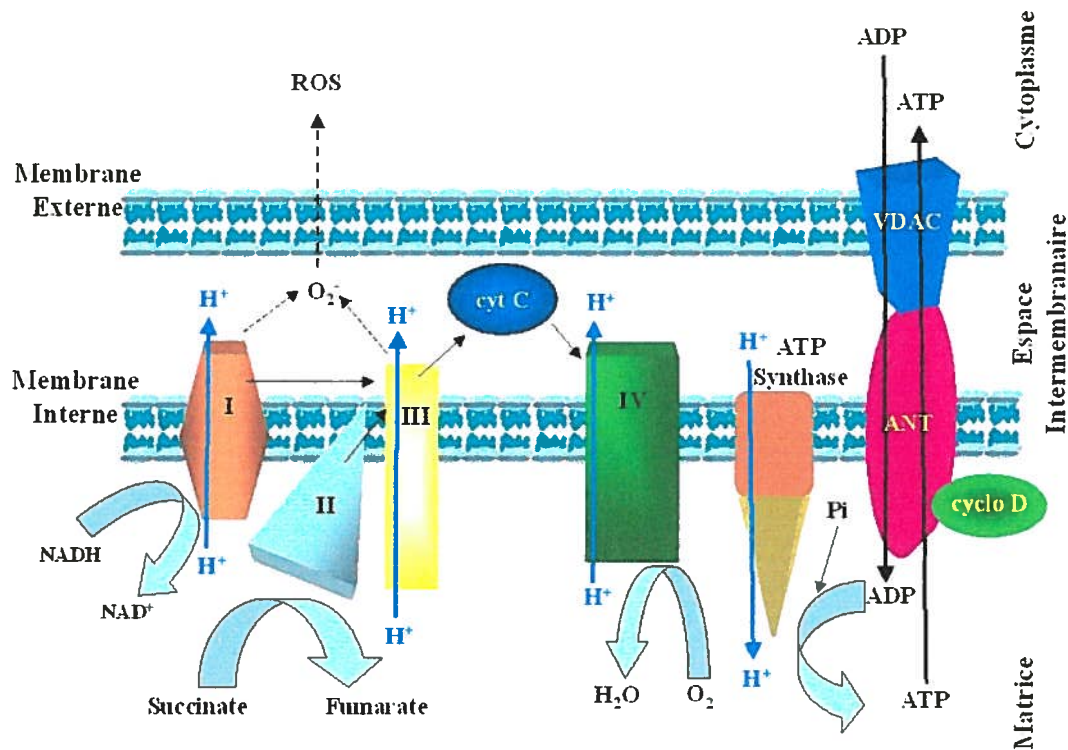
perméabilisation de la membrane mitochondriale [87]. La carence en sérum peut aussi induire la voie intrinsèque. Elle induit la stabilisation de p53 [88, 89].

La mitochondrie est le point central de la voie intrinsèque de l'apoptose. La mitochondrie est une organelle de la cellule qui sert à la production d'énergie par la production d'ATP nécessaire au support des fonctions cellulaires [90, 91]. La principale source de production de l'ATP par la mitochondrie se fait par l'échange d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons [90, 91]. Les cinq complexes de la chaîne de transport s'échangent des électrons et transforment le potentiel d'énergie des électrons en gradient de charge entre la membrane interne et la matrice (potentiel transmembranaire), afin de transformer de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP pour générer l'énergie de la cellule. L'ADP et l'ATP sont échangés entre le cytosol et la matrice par le pore de transition mitochondriale, qui est formé, en partie, de la protéine de canaux anioniques voltage dépendant (VDAC), la protéine de translocation de nucléotide adénine (ANT) et de la cyclophiline D [90-94]. Il est intéressant de mentionner que le blocage du transfert d'électron au niveau du complexe I et III ou le manque d'accepteurs finaux, soit de l'ADP, au niveau du complexe V, occasionnera une surcharge de la chaîne de transport d'électron, pouvant résulter en une production majeure de radicaux d'oxygène (anions superoxydes) [90, 95, 96]. Il semble aussi que le ratio d'ATP/ADP dans la cellule joue un rôle déterminant dans la décision de la mort cellulaire que prendra la cellule. Leist et al. en 1997 ont en effet démontré par des expériences de déplétion/réplétion d'ATP chez des cellules T, que le niveau d'ATP détermine le type de mort cellulaire que subit une cellule [97]. En présence d'ATP, la cellule va mourir par apoptose, alors que la

cellule va mourir en nécrose en absence d'ATP. La production d'ATP par la mitochondrie joue donc un rôle important dans la détermination du mode de mort cellulaire [97].

Les fonctions de la mitochondrie ne sont pas que de fournir de l'énergie à la cellule, mais elle contient aussi tout un arsenal pro-apoptotique [82, 98]. Pendant le début des étapes de l'apoptose, la membrane externe de la mitochondrie devient perméable aux protéines, alors que la membrane interne continue de contenir les protéines de la matrice. La perméabilisation de la membrane mitochondriale (PMM) initie la dissipation du potentiel transmembranaire de la mitochondrie et induit la relâche du contenu intermembranaire dans le cytosol [82, 98]. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 inhibent la PMM, alors que les membres pro-apoptotiques de la famille vont en faciliter la PMM [82, 98]. Plusieurs facteurs pro-apoptotiques, comme le cyt C [99], Smac/DIABLO [100], Omi/HtrA2 [100], facteur d'initiation de l'apoptose (AIF) [101] et l'endonucléase G (endoG) [100], sont relâchés dans le cytosol par la mitochondrie lors de la PMM [60, 61, 102]. Cependant, le cyt C n'est probablement pas entièrement relâché dans le cytosol, parce qu'il est nécessaire à la chaîne de transport d'électrons [103]. En effet, une conséquence de la perte de la chaîne de transport d'électrons devrait être une diminution de la production d'ATP. Nous savons que l'ATP semble être requis pour les événements subséquents de l'apoptose [104]. Or, une diminution d'ATP a été observée durant l'apoptose, mais cet événement survient tardivement dans le processus apoptotique [105]. S'il n'y a pas rupture de la membrane externe de la mitochondrie ou que le cyt C est en excès, il est possible qu'une partie du cyt C reste

associé par le site d'attachement à haute affinité à la cytochrome c oxydase et au cytochrome b-c<sub>1</sub>, maintenant la chaîne d'électrons. En fait, il a été démontré que suite à la PMM et la relâche du cyt C, le potentiel transmembranaire est maintenu [105, 106]. La perte du potentiel transmembranaire s'effectue bien après la relâche du cyt C et l'activation des caspases [105]. On a ensuite démontré qu'une partie du cyt C reste présent au niveau inter-membranaire et est suffisant pour maintenir le potentiel transmembranaire et produire de l'ATP [107]. Mais suite à une rupture complète de la membrane externe de la mitochondrie ou d'une disponibilité réduite de cyt C, il est possible de perdre la chaîne de transport d'électrons et de ne pas être capable d'induire les caspases, ce qui entraîne la cellule vers une mort nécrotique [103].



**Figure 1. Schéma de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie**

La chaîne de transport d'électron de la mitochondrie est la principale source de synthèse d'ATP dans la cellule. Les quatre complexes de la chaîne se retrouvent enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie. L'objectif de la chaîne est de créer un gradient de protons (en bleu) entre l'espace intermembranaire et la matrice, afin de permettre la synthèse d'ATP par le complexe V (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase ou ATP synthase) à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Le complexe I (NADH :ubiquinone oxydoréductase), par le métabolisme du NADH, et le complexe II (succinate déhydrogénase), par le métabolisme du succinate, produisent des électrons, qui sont transférés successivement vers le complexe III (cytochrome bc<sub>1</sub>) par la coenzyme Q. Les électrons sont ensuite transférés au cyt C, ce qui les amènent

au complexe IV (cytochrome c oxydase ou cytochrome aa<sub>3</sub>), afin de favoriser la formation du gradient de protons (trajet des électrons en noir). Le substrat de l'ATP synthase, l'ADP, et son produit, l'ATP, sont échangés entre la matrice et le cytoplasme par un complexe protéique formé de VDAC, ANT et la cyclophiline D. Un blocage dans la chaîne de transport d'électron au niveau du complexe I et/ou III peut entraîner la production d'anions superoxydes, qui génèrent des ROS. (Figure adaptée de [90, 91])

L'implication exacte des membres de la famille Bcl-2 au niveau de la perméabilisation de la membrane mitochondriale n'est pas nettement définie. Plusieurs hypothèses ont été avancées, mais aucune n'a été prouvée définitivement [74-76, 108]. Trois modèles de base existent : premièrement, la similitude de structure entre Bcl-xL et la sous unité de formation de pore de la toxine diphtérique [109] suggère que les protéines de la famille Bcl-2 peuvent intégrer une bicouche lipidique suite à un changement conformationnel. En effet, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent s'insérer dans une bicouche lipidique et former des canaux [76], qui serait suffisant pour laisser sortir les protéines de la mitochondrie. Deuxièmement, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourraient aussi interagir avec d'autres protéines de la membrane externe de la mitochondrie [76] pour former des canaux. Une protéine candidate serait la VDAC, avec laquelle les membres pro-apoptotiques peuvent interagir et réguler son activité [110]. Finalement le troisième, implique que les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induisent la rupture de la membrane extérieure mitochondriale par une déstabilisation des couches lipidiques. Les signaux apoptotiques changent la physiologie de la mitochondrie et causent son gonflement, qui résulte en la rupture physique de la membrane externe permettant la diffusion des protéines intermembranaire mitochondriale dans le cytosol [111]. L'homéostasie mitochondriale pourrait être influencée par la formation de pore soit directement par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et/ou par l'interaction avec des protéines mitochondriales, comme VDAC qui est une sous unité impliquée dans la formation du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (PTP) [19, 111]. L'ouverture rapide du PTP induit la relâche du cyt C et à une mort cellulaire

apoptotique, alors qu'une inhibition chimique du PTP joue le rôle d'un inhibiteur de la relâche du cyt C et inhibe par le fait l'apoptose [112].

Le cyt C cytosolique interagit avec Apaf-1 et la caspase-9, en présence d'ATP et crée un complexe enzymatique appelé l'apoptosome [19]. L'apoptosome active la caspase-3 et débute une cascade d'activation de caspases responsables de la transformation des caspases-2, -6, -7 et -10. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, qui sont aussi relâchées suite au PMM, bloquent l'inhibition de l'apoptose médiée par les IAP. Ils fournissent donc un excellent moyen pour s'assurer une exécution de l'apoptose rapide et irréversible [102]. Smac/ DIABLO a aussi été montré comme pouvant former un complexe stable avec XIAP près d'un site d'attachement impliqué dans l'inhibition de la caspase-3 et -7 [113-116]. La relâche cytosolique de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 permet la captation des IAP, qui inhibent normalement les caspases situés en aval de la mitochondrie [60, 61, 69]. En conséquence, l'apoptose ne peut se produire qu'au moment où la concentration de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 atteint un niveau suffisant pour inhiber les effets des IAP et permettre une activation des caspases effectrices.



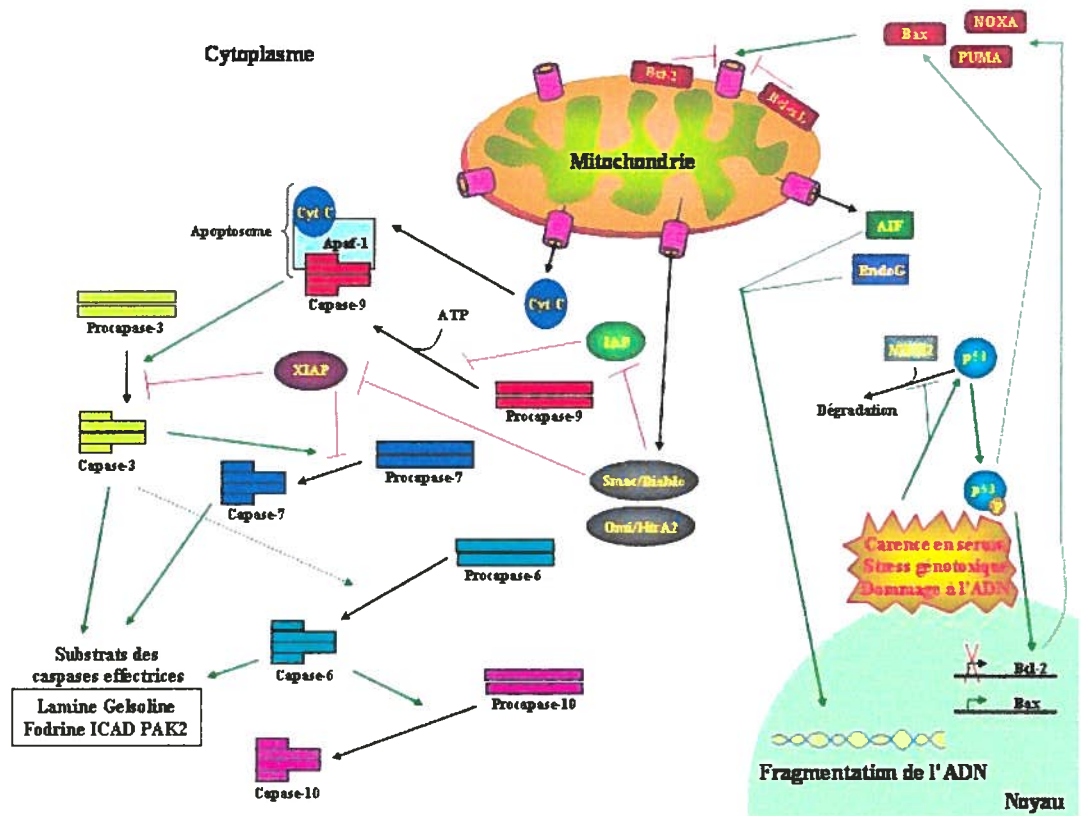


Figure 2. Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose

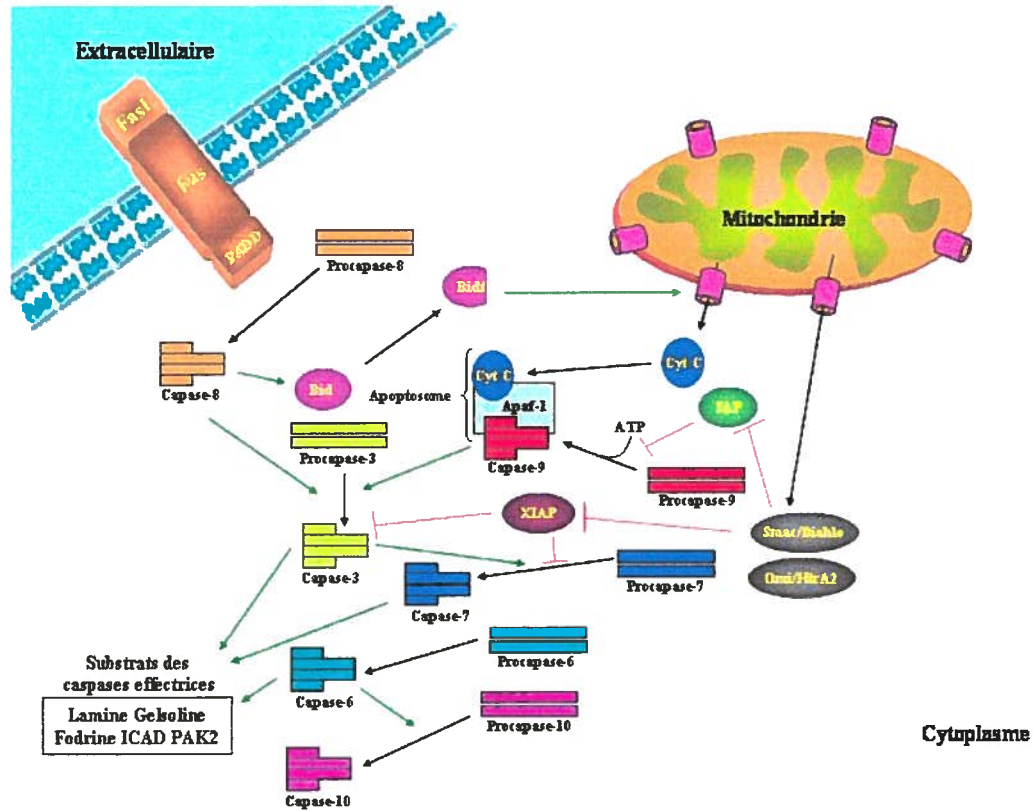
L'activation de la voie intrinsèque peut se faire suite à différents stress, comme une carence en sérum ou un dommage à l'ADN. Ces stress entraînent une phosphorylation de p53, ce qui prévient sa dégradation par MDM2 et cause son accumulation. p53 phosphorylée stimule la transcription de protéines proapoptotiques (ex. : Bax) et diminue l'expression de Bcl-2. Les protéines proapoptotiques, une fois produites, se relocalisent à la mitochondrie et induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale (PMM), alors que Bcl-2 et Bcl-xL inhibent la PMM. PMM permet la relâche du cyt C, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, AIF et endoG vers le cytoplasme. La relocalisation nucléaire de AIF et endoG permet la

fragmentation de l'ADN. Le cyt C s'attache à la caspase-9 par l'intermédiaire de la protéine Apaf-1 en présence d'ATP pour former l'apoptosome qui peut activer les caspase effectrices. Dans la voie intrinsèque, les IAP bloquent la formation de l'apoptosome en s'attachant à la caspase-9. Smac/Diablo et Omi/HtrA2 empêchent l'inhibition des caspases par XIAP et les IAP. (Figure adaptée de [17-19, 117])

### 1.1.2.1.5 La voie extrinsèque

Les récepteurs membranaires, tels : Fas et TNF, possèdent des domaines d'interactions importants, le domaine de mort cellulaire (DD) (par exemple : TNF-R1 (DD)), alors que les protéines adaptatrices peuvent posséder à la fois le DD et le domaine effecteur de mort cellulaire (DED) (par exemple : TRADD (DD), FADD (DD et DED), pro-caspase-8 (DED)). Le DD et le DED interagissent ensemble pour recruter les protéines impliquées dans l'activation de la caspase-8. Certaines caspases possèdent des domaines CARD (Domaine de Recrutement Associé aux Caspases) en N-terminal leur permettant d'interagir avec des protéines adaptatrices (caspase-9 et Apaf-1) [118]. Les récepteurs de mort à la surface des cellules suite à l'interaction avec leurs ligands, comme Fas/FasL et TNF-R/TNF, sont capables d'initier l'activation des caspases en partie, de façon indépendante de la voie mitochondriale [119]. La caspase-8 est activée via la protéine FADD après la trimérisation de Fas/FasL. Pour que l'apoptose se produise, la pro-caspase-8 doit s'accumuler au niveau du FADD. L'accumulation de pro-caspase-8 mène à son auto-activation par auto-clivage. La caspase-8 peut ensuite activer la caspase-3, suivie par la cascade des caspases effectrices en aval. Le clivage des substrats des caspases menant aux changements morphologiques de l'apoptose [118]. Cependant, les IAP peuvent bloquer l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose [42, 43]. Il existe aussi une communication croisée entre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose. Le clivage de Bid, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, par la caspase-8

permet la formation d'une forme tronquée de Bid (tBid) [120-122] qui peut ensuite induire la relâche cytosolique de protéines apoptogéniques mitochondriales, incluant le cyt C [99], Smac/DIABLO [100] et Omi/HtrA2 [100]. Il existe des cas où la quantité de procaspase-8 recrutée par le complexe protéique associé au récepteur de mort cellulaire n'est pas suffisante pour engendrer une auto-activation des caspases assez importante pour induire l'apoptose de la cellule. Par contre, le signal pro-apoptotique peut être amplifié par la voie mitochondriale via l'action de la protéine tBid [120-122].



**Figure 3. Schéma de la voie extrinsèque de l'apoptose**

La voie extrinsèque débute par l'attachement du ligand de Fas (FasL) au récepteur Fas et la trimérisation du récepteur. La procaspase-8 s'accumule au récepteur via la FADD. L'accumulation de procaspase-8 produit l'auto-activation de la caspases-8. La caspase-8 activé clive Bid pour former la forme tronquée (Bidt), qui se relocalise à la mitochondrie et induit la relâche cytosolique du cyt C, Smac/Diablo et Omi/HtrA2 vers le cytoplasme. La caspase-8 active aussi la caspase-3. L'activation de la caspase-3 est commune à la fois à la voie intrinsèque et extrinsèque. XIAP inhibe l'activation de la caspase-3 et -7. Le cyt C s'attache à la caspase-9 par l'intermédiaire de la protéine Apaf-1 en présence d'ATP pour former l'apoptosome qui peut activer les

caspase effectrices. Les IAP bloquent la formation de l'apoptosome en s'attachant à la caspase-9. Smac/Diablo et Omi/HtrA2 empêchent l'inhibition des caspases par XIAP et les IAP. (Figure adaptée de [17-19, 117])

#### 1.1.2.1.6 Le stress oxydatif

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) et de nitrogène (RNS) ont été impliquées dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique et non-apoptotique [16, 123]. Une augmentation dans le niveau de production des ROS est parfois observée dans des processus d'apoptose [124-131]. Cependant, des études ont démontré que la stimulation du récepteur Fas n'induit pas la production de ROS [132] et que les changements typiques de la membrane en apoptose se produisent en absence de ROS [133, 134]. Il semble alors que les conditions pro-oxydatives ne sont pas en général un pré requis pour la mort cellulaire de type apoptotique [135]. Mais de hautes concentrations de ROS induisent l'apoptose dans plusieurs types cellulaires [136, 137], ce qui suggère que les ROS contribuent à la mort cellulaire lorsqu'ils sont générés dans un contexte de processus apoptotique [135]. L'apoptose dépendante des RNS a été observée dans plusieurs modèles expérimentaux [138-142]. L'induction de l'apoptose de différentes lignées cellulaires leucémiques humaines par le monoxyde d'azote (NO) est associée avec une diminution de la concentration de cardiolipine, le plus important lipide de la membrane mitochondriale, une diminution de l'activité de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et la relâche de cyt C de la mitochondrie vers le cytosol [143, 144]. Cependant, certains types cellulaires, comme les cellules endothéliales de la microvasculature, sont extrêmement résistante à l'induction de l'apoptose par le NO [145]. Le NO peut donner une protection à l'apoptose dans différents types cellulaires en inhibant certaines caspases [118, 146-

148]. Un haut niveau intracellulaire de glutathione est associé à une augmentation de la résistance à l'apoptose induite par le NO [144].

### **1.1.2.2 La mort cellulaire programmée non-apoptotique**

Il est maintenant clair que l'inhibition de l'activation des caspases ne protège pas nécessairement contre un stimulus de mort cellulaire. Il pourrait plutôt mettre en évidence des programmes de mort cellulaires indépendants, qui joueraient le rôle de plans de rechange [16]. Des voies de mort cellulaire alternative indépendantes des caspases peuvent avoir évolué pour remplir la même fonction dans la cellule que la voie classique de l'apoptose, garantir une façon sécuritaire et non inflammatoire de retirer les cellules [16]. En effet, l'inhibition des caspases semble mettre à jour ou même stimuler l'émergence de MCP caspase indépendante [16]. Comme la voie classique de l'apoptose, les voies alternatives de mort cellulaire programmée peuvent être médiées par des protéases non spécifiques [149]. De plus, plusieurs protéases autres que les caspases peuvent cliver une partie des substrats normaux des caspases, ce qui indique qu'elles pourraient mimer les effets cellulaires des caspases [150-157]. En fait, ces programmes de mort cellulaires peuvent ressembler à des MCP semblables à l'apoptose ou à la nécrose. Dans plusieurs modèles expérimentaux d'apoptose, l'utilisation d'inhibiteurs pan-caspases a permis de démontrer l'existence de voies de mort cellulaire de remplacement [16]. Il existerait en fait trois modes de MCP : l'apoptose, la MCP semblable à l'apoptose et la MCP semblable à la nécrose. Ces modes de MCP se caractérisent par un point commun important absent de la



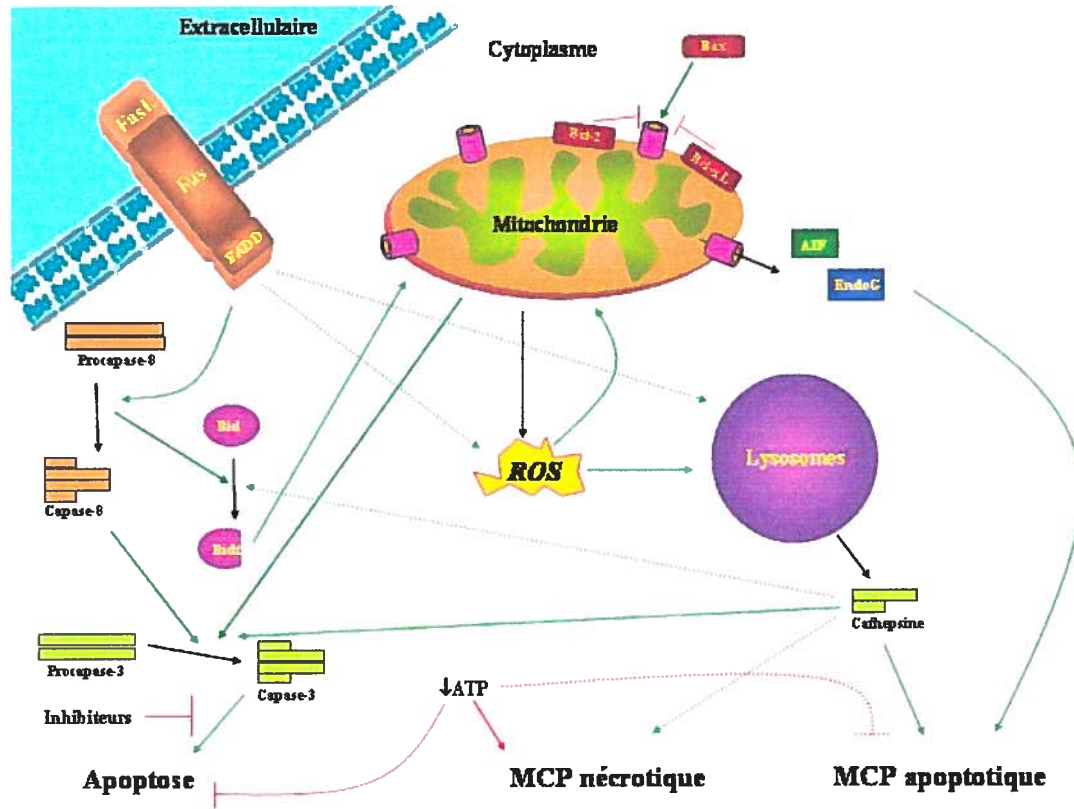
nécrose accidentelle; elle peuvent être inhibée à l'aide d'inhibiteurs dirigés contre un élément moléculaire régulateur de leur cascade de mort [16].

Nous savons que l'apoptose se caractérise par des changements morphologiques stéréotypiques, principalement au niveau du noyau où la chromatine se condense de façon compacte et prend l'apparence de formes géométriques simples (globulaire) [2]. Les autres particularités incluent l'externalisation de la phosphatidylsérine, le rétrécissement cytoplasmique, la zéïose et la formation de corps apoptotiques. Dans sa forme la plus classique, l'apoptose est observée avec l'activation des caspases, principalement la caspase-3 [16]. Dans les cas de MCP semblables à l'apoptose, on retrouve une condensation de la chromatine qui est moins compacte et des degrés et combinaisons de caractéristiques apoptotiques variables [16]. Finalement, la MCP semblable à la nécrose définit une MCP en absence de condensation de la chromatine avec une formation, à différent degré, de caractéristiques de l'apoptose avant la lyse cellulaire [16]. Quoique ce type de MCP se fasse en absence de l'activité des caspases exécutrices classiques, l'activation de la caspase-8 et de la caspase-1 a été observée dans ce type de MCP. En effet, l'activation de la caspase-8 se produit en association avec la ligation et l'activation des récepteurs de mort cellulaire de la voie extrinsèque de l'apoptose [82], alors que la caspase-1 joue un rôle principalement dans la maturation des cytokines [158]. Cependant, l'activation de la caspase-8 et de la caspase-1 a été récemment impliquée dans la régulation de la mort cellulaire programmée non-apoptotique [16, 159-162]. La mort nécrotique des cellules qui suit l'inhibition d'un programme d'apoptose

classique qui emprunte des voies caspases indépendantes pour compléter la mort, se retrouve aussi dans cette catégorie.

Les caspases sont nécessaires pour compléter les manifestations caractéristiques de la morphologie apoptotique et elles sont importantes pour le développement de la mort cellulaire dans plusieurs systèmes, cependant elles ne sont peut-être pas toujours requises. Des évidences récentes démontrent que des protéases, comme les cathepsines B, D et L, peuvent induire une MCP dépendante ou indépendante des caspases [117]. Les cathepsines sont des protéases lysosomales. On retrouve 11 cathepsines chez l'humain [163]. Selon le type cellulaire et le stimulus, les cathepsines peuvent fonctionner avant ou après les caspases, ou même complètement indépendamment des caspases [117]. Dans la majorité des modèles de mort cellulaire dépendants des lysosomes, les cathepsines transloquent ou sont relâchées des lysosomes vers le cytosol et/ou le noyau avant l'apparition de changements morphologiques indicatifs de MCP [164-167]. Nous savons aussi que le stress oxydatif a été impliqué dans la perte de PT au niveau de la mitochondrie [131]. Une déstabilisation des lysosomes et la translocation de la cathepsine D des lysosomes vers le cytosol suite à une augmentation du stress oxydatif ont été observées, menant à la mort cellulaire [164, 165]. Finalement, les cathepsines et les caspases partagent plusieurs substrats communs, comme les caspases, la poly(ADP)ribose polymérase, la protéine Bid et la phospholipase cytosolique A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) [155, 168-170].

Des études récentes démontrent que AIF peut induire l'apoptose dans les cellules de mammifères d'une manière caspase indépendante [171]. Une fois relâchée de la mitochondrie, AIF se relocalise vers le noyau et provoque la condensation de la chromatine, ainsi qu'une fragmentation à grande échelle de l'ADN [101]. L'endoG possède aussi une activité de fragmentation de l'ADN caspase indépendante [31, 172]. La fragmentation de l'ADN, induite par l'endoG et AIF, mène à une condensation de la chromatine qui est moins compacte que la condensation qui se produit durant la MCP caspase dépendante. Elle remplace donc l'activité de clivage de l'ADN de la DNase activée par les caspases (CAD), qui est normalement activée par les caspases durant l'apoptose classique [16].



**Figure 4. Schéma des mécanismes impliqués dans les différentes formes de mort cellulaires programmées.**

La stimulation de la mort cellulaire programmée apoptotique classique (apoptose) peut survenir suite à une stimulation au niveau de la mitochondrie, qui mène à l'activation des caspases effectrices (principale caspase-3), ou des récepteurs membranaires (ex. : Fas), qui mène aussi à l'activation des caspases effectrices. Une inhibition des caspases, qui bloque l'apoptose, peut rediriger la mort cellulaire vers une mort cellulaire programmée semblable à l'apoptose (MCP apoptotique) ou semblable à la nécrose (MCP nécrotique). D'autres protéases (ex. : les cathepsine) peuvent cliver des substrats des caspases et contribuer au développement de la MCP

apoptotique et MCP nécrotique. Les cathepsines sont des protéases lysosomales, qui peuvent être libérées suite à une déstabilisation des lysosomes par un stress oxydatif (ROS). Les ROS peuvent être produits par les récepteurs membranaires et par les mitochondries. Les ROS déstabilisent les lysosomes, mais aussi les mitochondries. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (ex. : Bcl-2, Bcl-xL) favorisent la stabilité de la mitochondrie, alors que les membres pro-apoptotiques (ex. : Bax) en favorisent la déstabilisation. AIF et l'endoG remplacent l'activité de CAD pour la fragmentation de l'ADN en MCP apoptotique. L'apoptose et la MCP apoptotique nécessitent de l'ATP pour leurs processus de mort cellulaire, suite à une diminution de la concentration d'ATP la mort cellulaire est redirigée vers la MCP nécrotique. (Figure adaptée de [117])

## 1.2 Système vasculaire

Le système vasculaire est un réseau de vaisseaux sanguins qui permet de distribuer des nutriments dans tout l'organisme et de transporter les déchets vers les organes qui en effectueront l'élimination. On doit la découverte de la circulation sanguine à William Harley, un médecin du XVII<sup>e</sup> siècle. Le système vasculaire ne fonctionne pas du tout comme un système de plomberie. Les vaisseaux ne sont ni rigides, ni statiques, mais ce sont plutôt des structures dynamiques qui se contractent, se relâchent et prolifèrent selon les besoins. Les vaisseaux sanguins se divisent en quatre grandes catégories : les artères, les artérioles, les capillaires et les veines.

Les artères et les artérioles transportent le sang du cœur vers les tissus. Les grosses artères élastiques quittent le cœur et se divisent en artères musculaires de moyenne dimension pour se ramifier dans différentes régions de l'organisme en artères, qui se diviseront encore en artérioles. Les artérioles se divisent elles aussi en vaisseaux microscopiques, qui sont les capillaires. Les capillaires permettent l'échange des nutriments et des déchets entre le sang et les tissus. Les capillaires se regroupent au moment de sortir des tissus en veinules. Les veinules vont fusionner pour former les veines qui augmentent progressivement de taille. Les veines retournent le sang vers le cœur [173].

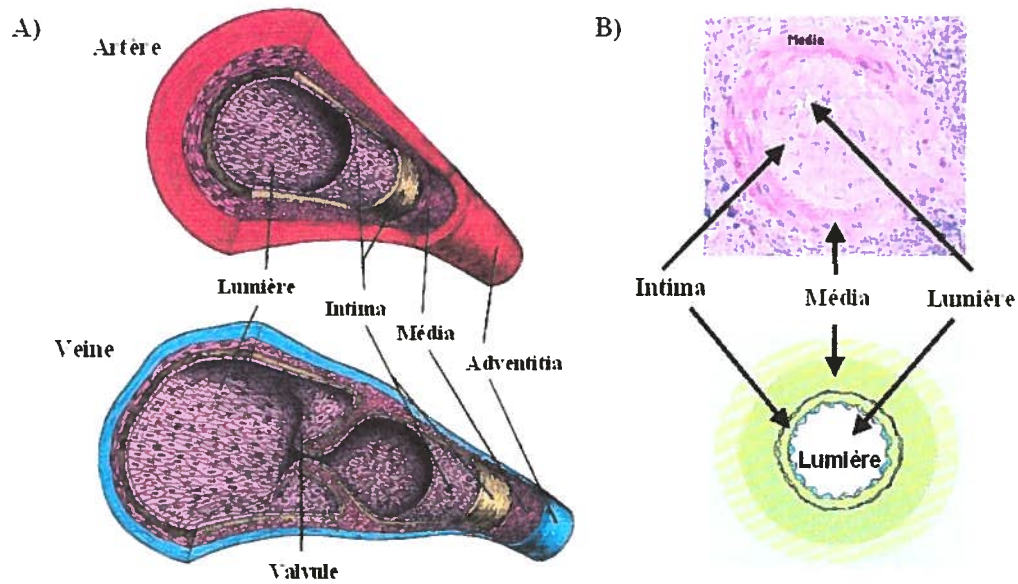
La paroi des artères, des artérioles et des veines est composée de trois couches ou tuniques, qui entourent la cavité centrale remplie de sang, la lumière. La tunique

interne ou intima est formée d'endothélium, qui est composée d'une couche de cellules endothéliales (CE). Les cellules endothéliales ont pour fonction principale de prévenir la formation de caillots, en formant une couche non adhésive pour les plaquettes et une surface lisse pour réduire la friction entre le sang et la surface des vaisseaux, afin de prévenir un éclatement des globules rouges [173]. Il joue aussi un rôle important dans la régulation de la perméabilité vasculaire [173]. L'endothélium repose sur une membrane basale formée de collagènes, laminines et de protéoglycans [174, 175]. La tunique moyenne ou média est formée de cellules musculaires lisses (CML) disposées en anneaux. C'est cette couche qui est responsable de la vasoconstriction et de la vasodilatation [173]. Finalement, on retrouve la tunique externe ou adventice, qui est composée de fibroblastes, tissus conjonctifs et de fibre de collagène, qui est responsable du soutien et de l'attachement des vaisseaux aux structures environnantes [173].

À cause principalement de la structure de la media, les artères possèdent des propriétés importantes, soit l'élasticité et la contractilité. L'élasticité permet aux grosses artères d'absorber le débit sanguin propulsé par le cœur d'un coup et de le distribuer graduellement dans les artères élastiques par la suite, afin de conserver un débit sanguin constant dans les vaisseaux. La contractilité permet pour sa part de régler la pression sanguine en jouant sur la dimension de la lumière des vaisseaux. La vasoconstriction permet de diminuer la lumière par la contraction des cellules musculaires lisses et la vasodilatation permet l'augmentation de la lumière par la relâche des cellules musculaires lisses. La contractilité des artères est aussi importante lors de lésions. Une artère sectionnée peut entraîner de forte perte de sang,

la contraction de la paroi permet de ralentir les pertes sanguines, mais il y a des limites au pouvoir de la vasoconstriction [173].





**Figure 5. Représentation de la structure des artères et des veines**

A) Représentation des différentes couches qui forment les artères et les veines. La lumière se trouve au centre, là où le sang circule. On retrouve en premier l'intima, qui est formé d'une couche de cellules endothéliales, l'endothélium, et de la membrane basale. La média est formée de cellules musculaires lisses. Finalement, on retrouve l'adventice, qui est formé de tissus conjonctif, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes. Dans les veines, on retrouve des valvules qui empêchent le retour du sang en arrière. B) Photographie représentant l'effet de l'épaississement myo-intimal sur la lumière d'un vaisseau lors d'un rejet chronique du greffon rénal. Les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima, ce qui en augmente l'épaisseur.

Une fois la limite de l'élasticité du vaisseau atteinte, l'intima se développe vers l'intérieur du vaisseau, obstruant la lumière et bloquant le passage du sang. (Figure adaptée de [173]).

## **1.2.1 Les composantes de la paroi vasculaire**

### **1.2.1.1 L'endothélium**

L'endothélium est composé d'une monocouche continue de CE reliées entre elles par différents types de structures adhésives ou jonctions cellule-cellule et cellule-matrice [176-180]. Il joue un rôle important dans la régulation de la perméabilité vasculaire en servant de barrière entre le sang et la membrane basale. Il permet de réguler le passage des cellules et nutriment entre le sang et la membrane basale. En condition normale, il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire par ces caractéristiques : anti-coagulant, anti-thrombotique, vasodilatateur et non adhésif pour les leucocytes.

En effet, les CE normales sécrètent de la prostacycline ( $PGI_2$ ) et le NO [181], ce qui stimule l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) dans les plaquettes et prévient leurs agrégations [182]. Les CE expriment aussi au niveau de la surface luminale des ectonucléotidases qui hydrolysent l'ATP et l'ADP, deux agents qui favorisent l'agrégation des plaquettes [183]. Les CE jouent aussi un rôle en stimulant plusieurs voies anti-coagulantes. Les CE expriment la thrombomoduline qui se complexe avec la thrombine pour bloquer son action. Le complexe thrombomoduline-thrombine active la protéine C, qui est produite par les CE. La protéine C activée interagit avec la protéine S, produit par les CE, et inactive deux

cofacteurs de coagulations : soit le facteur VIII activé et le Facteur V activé [184]. La surface des CE est aussi riche en glycosaminoglycans héparines auxquels s'attachent de l'anti-thrombine. Les CE participent à l'élimination du facteur X activé en exprimant des récepteurs pour l'endocytose du facteur. Les CE participent aussi à la fibrinolyse en relâchant de manière constitutive l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur de l'activateur plasminogène type 1 (PAI-1) [185]. Furchgott et Zawadzki en 1980 ont démontrés que la relaxation des CML en réponse à l'acétylcholine est dépendante de l'intégrité de l'endothélium [186]. Finalement, deux composés ont été identifiés comme responsable de la vasodilatation, le NO [187] et le PGI<sub>2</sub> [188], et les deux composés sont exprimés de façon constitutive et inductible (ex. INOS) par les CE.

Les CE n'expriment pas de molécules d'adhésion pour les leucocytes ou monocytes de façon normale, mais une modification de l'état des cellules endothéliales peut mener à une interruption de leurs caractéristiques normales. Les CE doivent recevoir un stimulus pour exprimer des molécules d'adhésion. Nous savons qu'un stimulus pro-inflammatoire peut induire un changement de la balance vers un phénotype procoagulant et pro-thrombotique avec l'expression de molécules d'adhésion [188, 189]. Une dysfonction de l'endothélium causée par une modification des CE qui deviennent apoptotiques peut aussi provoquer l'expression de molécules d'adhésion. Les cellules endothéliales subissant une apoptose deviennent pro-adhésives pour les plaquettes non-activées [190] et sont hautement pro-coagulantes à cause de l'augmentation d'activité à la surface cellulaire du facteur tissulaire [191] et de l'externalisation de la phosphatidylsérine [191-194]. L'induction

de l'apoptose des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) active une boucle paracrine qui augmente, dans les cellules endothéliales environnantes, l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) et les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) [195]. Le blocage de  $Il-1\beta$  durant la stimulation de l'apoptose des cellules endothéliales atténue seulement partiellement l'état d'hyper-adhésion [195]. En résumé, les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, alors que l'apoptose des cellules endothéliales est associée à l'initiation du développement de maladies vasculaires.

#### **1.2.1.2 La membrane basale**

La membrane basale (MB) est une structure en forme de feuillet, amorphe et dense avec une épaisseur d'environ 50 à 100 nm identifiée par microscopie électronique [196, 197]. La MB est semblable à la matrice extracellulaire, un matériel qui est présent dans tout l'interstitium [197]. La MB est toujours en contact avec les cellules et elle a pour fonction d'offrir un support structurel, de diviser les tissus en compartiment et de réguler le comportement des cellules [198, 199]. Les constituants de la MB sont de larges molécules insolubles qui s'unissent ensemble pour former une structure en forme de feuillet par un processus connu comme "auto-assemblage" [197, 200-202]. Il est connu que les cellules produisent les constituants de la MB, dont les principaux sont les collagènes, les laminines, les nidogènes et les protéoglycans [197, 203]. L'importante complexité de la structure a été découverte

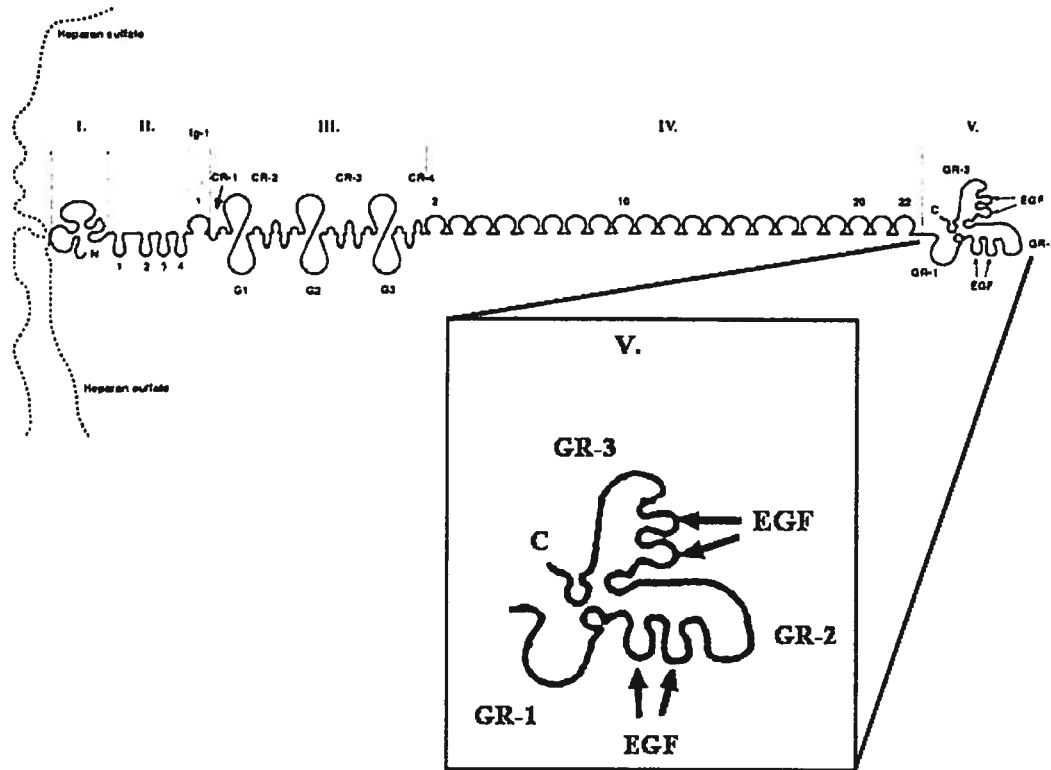
lorsque des molécules de la MB ont été retrouvées exprimées spécifiquement dans certains organes durant les derniers 10 ans [197].

Sur les 25 isoformes de collagènes identifiés, la MB vasculaire contient plus spécifiquement les collagènes de type IV, VI, XV et XVIII [204-206]. Le collagène de type IV est le plus abondant de la MB. Il est différent des autres parce que c'est celui qui peut s'"autoassembler" en un réseau organisé [197]. La formation du réseau de collagène de type IV est très importante pour la stabilisation et l'assemblage de la MB [207, 208]. Les collagènes de type IV, XV et XVIII renferment aussi des facteurs cryptiques anti-angiogéniques (arestines, tumstatine, endostatine et un facteur semblable à l'endostatine), qui sont libérés par les métalloprotéinases [197]. Les laminines sont aussi un des principaux constituants de la MB [203]. En fait, les laminines forment un réseau de contact avec les cellules avoisinantes de la MB par une interaction avec des récepteurs et des sites d'ancrages, principalement les intégrines et les dystroglycans [209-211]. Les laminines semblent aussi avoir plusieurs effets (adhésion, différenciation et migration) sur les cellules adjacentes [203], mais l'effet principal des laminines semble être la médiation de l'interaction entre les cellules et la MB [212]. Le collagène et les laminines forment donc deux réseaux importants pour la MB, mais sans affinité l'un pour l'autre. Les nidogènes ou entactines sont une autre composante majeure de la MB et leur rôle est de relier et de stabiliser l'interaction entre le réseau de collagènes et le réseau de laminines [213, 214]. Les nidogènes/entactines jouent également un rôle important dans l'intégration des protéoglycans dans la structure de la MB [214, 215].

On retrouve caractéristiquement trois protéoglycans dans la MB des mammifères : le perlécan, l'agrine et le bamacan. Le perlécan, qui prend son nom de sa forme en collier de perles, est le protéoglycan le plus important des composantes de la MB [216]. Ce protéoglycan à domaines multiples est un des produits les plus complexes, de part sa dimension (467 kD) [217] et son nombre élevé de modifications post-traductionnelles [218-221]. En fait, se protéoglycan consiste en un large corps protéique allongé avec une structure modulaire complexe et il est normalement substitué de plusieurs chaînes latérales de sulfate d'héparane et/ou de sulfate de chondroïtine [175, 222]. Il comprend 5 domaines distincts possédant chacun des modules homologues à plusieurs protéines différentes pouvant être impliqué dans le métabolisme des lipides, adhésion cellulaire et la croissance cellulaire [175, 223]. Le domaine I comprend trois sites d'attachements au sulfate d'héparane [224-227] et un module SEA, qui provient du nom des trois protéines où le module a été identifié en premier, soit la protéine de sperme, l'entérokinase et l'agrine. Le SEA devrait réguler l'attachement au carbohydrate environnant [228]. Le domaine II comprend quatre répétitions homologues à la portion d'attachement au ligand du récepteur au LDL [220, 223]. La structure du domaine démontre une forme globulaire et peut interagir avec le nidogène [229]. Le domaine III comprend lui trois domaines globulaires distincts, des modules LamB homologues au bras court de la laminine-1 [230], connectés par des régions riche en cystéines semblables au facteur EGF [231, 232]. Le domaine IV est le plus grand des cinq domaines et le plus répétitif avec 21 répétitions de séquence homologue aux immunoglobulines (IgG) [223] et pourrait être impliqué dans la dimérisation ou l'association intermoléculaire

[175]. Finalement, le domaine V possède trois régions globulaires distinctes homologues au domaine G du bras long de la laminine-1 connecté par des répétitions semblables au EGF (facteur de croissance épithéliale). Le domaine V comprend aussi deux sérines servant d'ancrage à la sulfate de chondroïtine [175] et un site LRE servant d'adhésion à la laminine-3 [233]. L'abondance et la dimension du perlécan corrént bien avec plusieurs fonctions biologiques prédites, qui incluent la participation à l'organisation moléculaire de la MB, les interactions matrice-cellules, l'entreposage et la relâche de plusieurs cytokines et le contrôle de la protéolyse extracellulaire [220, 234].





**Figure 6. Représentation de la structure du perlécan**

Représentation schématique de la structure multidomaine globulaire du perlécan. Chaque domaine est numéroté de I à V. Le domaine I en N-terminal comprend trois sites d'attachements au sulfate d'héparane. Le domaine II comprend quatre répétitions homologues à la portion d'attachement au ligand du récepteur au LDL (# 1 à 4). Le domaine III comprend lui trois domaines globulaires distincts (G1, G2 et G3), des modules LamB homologues au bras court de la laminine-1, connectés par des régions riche en cystéines semblables au facteur EGF (CR-1 à CR-4). Le domaine IV est le plus grand des cinq domaines et le plus répétitif avec 21 répétitions de séquence homologue aux immunoglobulines (IgG) (2 à 22). Finalement, le domaine V en C-terminal possède trois régions globulaires distinctes homologues au domaine

G du bras long de la laminine-1 (GR-1, GR-2 et GR-3) connecté par des répétitions semblables au EGF. (Figure adaptée et modifiée de [217])

### 1.2.1.3 Les cellules musculaires lisses

Les CML sont les cellules qui démontrent le plus de plasticité dans leur habileté à répondre à différents facteurs de croissance. En condition normale, les CML sont responsables de la vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux en réponse à différents facteurs produits par les CE. La production d'endothéline par les CE entraîne une vasoconstriction, alors que la production de NO et de PGI<sub>2</sub> produit une vasodilatation [187, 188]. En condition normale, les CML sont quiescentes et ne prolifèrent pas. En fait Campbell et Campbell en 1990 parlent d'un état contractile des CML, alors que dans une lésion les CML seraient dans un état synthétique [235]. Dans l'état synthétique, les CML pourraient répondre aux facteurs de croissance et synthétiser de la matrice extracellulaire [236]. Les CML activées vont pouvoir migrer vers la lumière artérielle et exprimer des composantes de la matrice et des protéases qui vont modifier la matrice environnante. Cette réponse de croissance et de synthèse des CML contribue au développement des lésions myo-intimales qui caractérisent l'athérosclérose [237].

Chez l'adulte, en homéostasie, les CML dans la paroi vasculaire possèdent un index de prolifération très bas [237]. Cependant, les CML matures peuvent subir des changements phénotypiques importants, comme la perte des myofilaments et une modification de l'expression des protéines du cytosquelette, qui engendrent une réorganisation structurelle de la cellule. Les cellules perdent leurs contractilités et

deviennent capables de migrer de la média à l'intima, de proliférer et de sécréter des composantes de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à l'épaississement myo-intimal [238]. Mais nous savons que les CML peuvent retourner à un état de quiescence. En utilisant différents modèles animaux d'angioplastie *in vivo*, plusieurs investigateurs ont démontré une réponse proliférative rapide des CML dans la média, suivit par une deuxième séquence de prolifération dans la myo-intima qui diminue ensuite à son niveau de base entre 2 et 6 semaines après l'insulte vasculaire [239-246].

Plusieurs facteurs de croissance et cytokines, comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance fibroblastique de base (bFGF), le facteur de nécrose de tumeur (TNF- $\alpha$ ), le facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (IGF-1), le facteur semblable au facteur de croissance épidermal d'attachement à l'héparine, l'interleukine-1 et le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), peuvent influencer la prolifération des CML *in vitro* et *in vivo*. L'expression de l'ARN messager et la concentration de ces facteurs sont généralement augmentées dans les lésions athérosclérotiques [236, 247-255]. Nous savons que les CML de la média et de la néointima au niveau d'une insulte artérielle expriment le TGF- $\beta$  [256]. Le traitement de lapins par le TGF- $\beta$  suite à une angioplastie augmente la croissance néointimale [257], alors qu'un anticorps bloquant pour le TGF- $\beta$  possède l'activité opposée [256]. En utilisant des anticorps neutralisant le bFGF et le PDGF, il a été démontré que leurs inhibitions bloquent l'accumulation de CML au niveau néointima suite à l'angioplastie [258, 259], alors que la surexpression de bFGF et de

PDGF stimule l'hyperplasie néo-intima [260, 261]. La stimulation de croissance produite par le PDGF et le facteur de croissance fibroblastique (FGF) semble impliquer la phospholipase C et les protéines kinases A et C [262-266]. Il semble aussi que les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK 1/2) peuvent être directement induites après un stress mécanique. Une induction de ERK 1/2 a été rapportée du jour 2 au jour 8 après une insulte à l'artère carotide d'un rat [267], alors qu'une induction soutenue de ERK-2 a été démontrée de 5 minutes à 14 jours suite à une insulte d'angioplastie carotide chez le rat [268]. La prolifération des CML est associée avec l'expression de la cycline kinase dépendante 2 (CDK2) et de ses sous-unités, la cycline E et A suite à l'angioplastie de l'artère carotide chez le rat [269].

Nous savons que le NO produit par les CE joue un rôle de vasodilatateur, mais il joue aussi le rôle d'inhibiteur de la croissance des CML [270, 271]. Plusieurs évidences démontrent un rôle du NO dans l'inhibition de la croissance des CML. En effet, des souris déficientes en enzyme eNOS (synthase de monoxyde d'azote endothéliale) ont un degré de croissance intimale augmentée, si on les compare aux souris sauvages, après une insulte artérielle [272, 273]. Alors que l'injection au niveau artériel de mitogènes pour les CE, qui accélère la réendothélisation, diminue l'épaississement myo-intimal après l'insulte vasculaire [274-276]. Finalement, l'administration de L-arginine un précurseur de NO ou le transfert *in vivo* de la NOS (synthase du NO) inhibent le développement de lésions myo-intimales dans plusieurs modèles animaux, incluant l'angioplastie et l'athérosclérose induites par le cholestérol ou une allogreffe [277-285]. Ces résultats impliquent le NO comme un régulateur négatif de la prolifération des CML, soit en condition normale ou après la

réparation suite à une insulte pour limiter l'épaississement myo-intimal. Différents groupes ont ainsi démontré que la surexpression par un adénovirus de p21 et p27 atténuent l'épaississement myo-intimal, suite à une angioplastie au niveau des artères [286-289]. L'addition de donneurs de NO à des CML synchronisées en privation de sérum induit l'expression de p21, inhibe l'activation de CDK2 normalement observée suite à une restimulation par le sérum, et bloque l'augmentation d'activité du promoteur de la cycline A et la prolifération des CML [290, 291].

Il semble cependant exister un facteur important qui influence la réponse des CML dans les différentes parties de l'arbre artériel aux différents stimuli qui génèrent les lésions athérosclérotiques, c'est l'origine des CML. En effet, il semble que les CML ont des origines embryonnaires différentes, selon le segment du système vasculaire qui est impliqué [292, 293]. De plus, des études débutées par Benditt et Benditt et continuées par d'autres équipes, suggèrent que les CML qui contribuent à la formation des plaques athérosclérotiques sont d'origine clonale [292, 294-298]. Des données *in vitro* démontrent qu'une stimulation, induite par une insulte, de sous-population de CML avec un potentiel prolifératif augmenté pourrait contribuer à l'épaississement de la paroi vasculaire [299]. Cet effet peut être produit par l'expansion d'une sous-population cellulaire spécifique, mais aussi par la sécrétion par ces cellules de mitogènes [299].

La formation de plaques monoclonales dans les lésions athérosclérotiques suggérait à l'origine que la maladie nécessitait la transformation non-maligne des CML, mais la formation des plaques monoclonales a maintenant été démontrée

comme étant le résultat du développement normal de la paroi [292, 300]. Mais, nous ne savons pas encore si la clonalité vient de l'expansion de cellules provenant de l'intima, de cellules qui ont migrées de la média [292, 298, 299] ou selon une nouvelle série d'études de la circulation sanguine [301]. En effet, des études récentes suggèrent que des CML dérivées de la moelle osseuse participent à la formation de néo-intima dans des modèles animaux de transplantations allogreffes, d'insultes mécaniques sévères et d'athérosclérose induite par une hyperlipidémie [301]. Mais il est certain que l'origine des CML et leur clonalité peut avoir une influence non négligeable sur la formation de lésions athérosclérotiques, de par leur réponse aux stimuli générés par l'athérosclérose [292, 293].

L'endothélium est donc l'élément clé qui contrôle la prolifération des CML. En condition normale, la croissance des CML est inhibée par l'endothélium, mais suite à une dysfonction de l'endothélium, l'inhibition est perdue et les CML se différencient en cellules plus plastiques sous l'action des facteurs de croissance, ce qui leur permet de proliférer et de migrer pour favoriser la réparation suite à l'insulte par un épaissement myo-intimal et un remodelage vasculaire temporaire. Une fois la réparation du vaisseau terminée, la réendothélisation permet au vaisseau de retrouver le contrôle de la croissance des CML. En effet, il a été démontré, suite à la comparaison entre une angioplastie d'artère carotide et fémorale chez le rat, qu'une réendothélisation plus rapide de l'artère fémorale a favorisé le retour plus rapide des CML au phénotype de contractilité et un épaissement néo-intimal moins prononcé [238]. L'endothélium reformé permet d'inhiber la croissance des CML et favorise leur transformation en cellules contractiles, ce qui empêche le remodelage vasculaire

et l'épaississement myo-intimal continue. Une dysfonction chronique de l'endothélium peut cependant entraîner le développement de complications vasculaires pathologiques, comme de l'épaississement myo-intimal et du remodelage vasculaire pathologique. Ces complications vasculaires seront discutées un peu plus loin.

### **1.2.2 L'angiogénèse**

L'angiogénèse est un processus qui se caractérise par la formation ou le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Cette croissance de nouveaux vaisseaux peut avoir plusieurs objectifs, soit permettre une recanalisation de la circulation sanguine dans un vaisseau suite à une insulte ou permettre une irrigation des zones où il y a manque d'oxygène ou de nutriments [302, 303]. Il est établi que le bourgeonnement angiogénique est facilité par l'hypoxie. Le facteur de transcription inductible par l'hypoxie (HIF) peut augmenter l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la formation et la maturation des vaisseaux [304]. Nous savons que le facteur le plus important pour la croissance des vaisseaux chez l'embryon et l'adulte est le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) [305-307]. Le VEGF a été défini, caractérisé et purifié pour son habileté à induire des fuites vasculaires, la perméabilité et aussi pour la stimulation de la croissance des cellules endothéliales [306, 307]. Il existe cinq membres de la famille VEGF, qui ont été identifiés en fonction de leurs homologies avec le VEGF, et trois récepteurs membranaires [305]. Le HIF peut induire l'expression de la NOS, qui produit du



monoxyde d'azote, qui favorise la vasodilatation des vaisseaux mature et sensibilise ces vaisseaux au VEGF, qui stimule la perméabilisation [308].

Pour permettre la croissance de nouveaux vaisseaux stimulée par le VEGF, la déstabilisation d'un vaisseau mature est nécessaire [302]. L'angiopoétine-1 (Ang1) et -2 (Ang2) semblent responsables de la régulation du signal de déstabilisation [302]. L'Ang1 interagit constitutivement avec le récepteur Tie2 dans les vaisseaux adultes et contribue au maintien de la stabilisation des vaisseaux [302]. L'Ang1 peut aussi rendre les vaisseaux résistants aux fuites et à la perméabilité induite par le VEGF [309]. L'Ang2 est induite dans l'endothélium des vaisseaux subissant un remodelage actif, comme un bourgeonnement ou une régression [310-315], et est un antagoniste du récepteur Tie2 [315]. Il semble que l'induction autocrine de Ang2 dans l'endothélium bloque l'influence de stabilisation paracrine constitutive de Ang1 [302]. Ang2 permettrait ainsi aux cellules endothéliales de revenir à un état plus plastique et de déstabilisation permettant une réponse aux facteurs de croissance (ex : VEGF) et le développement de vaisseaux [302]. Pour permettre le bourgeonnement de vaisseaux, une dégradation de la membrane basale est nécessaire par différentes protéinases, comme les métalloprotéinases de la matrice, l'activateur urinaire du plasminogène (u-PA), héparinase, chymases, cathepsine et tryptases [316-318]. Les protéinases vont faciliter le bourgeonnement des CE en dégradant la membrane basale et en libérant des activateurs angiogéniques attachés à la matrice, comme le bFGF, le VEGF et le TGF- $\beta$  [319]. Une dégradation insuffisante prévient le déplacement des cellules vasculaires de leur position originale, mais une dégradation excessive retire le support nécessaire à l'orientation des CE et inhibe l'angiogénèse

[318, 320]. Les protéines ont donc un rôle dans la résolution de l'angiogénèse en plus de libérer des inhibiteurs de l'angiogénèse, comme l'arestine, la tumstatine, l'endostatine et un facteur semblable à l'endostatine [197].

L'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel nécessite la maturation des nouveaux vaisseaux en vaisseaux durables. L'association de péricytes et de CML avec les nouveaux vaisseaux permet de réguler la prolifération, survie et migration des CE [308]. Le PDGF joue un rôle important dans le recrutement de cellules pour la stabilisation des nouveaux vaisseaux [319]. Une combinaison de PDGF et de VEGF permet en effet la formation de vaisseaux plus matures que l'utilisation d'une monothérapie avec l'un ou l'autre facteur [321]. Il a aussi été découvert, suite à des études d'inactivation chez la souris, que les éphrines, initialement caractérisées au niveau du système nerveux, semblent impliquées au niveau du développement vasculaire [302]. En fait, des embryons de souris sans l'éphrine-B2 et le récepteur EphB4 souffrent d'un manque fatal dans le remodelage angiogénique précoce qui ressemble à celui retrouvé chez les embryons de souris sans Ang1 ou Tie2 [322-324]. L'éphrine-B2 et le récepteur EphB4 démontrent aussi un patron de distribution réciproque durant le développement vasculaire, avec l'éphrine-B2 est exprimée spécifiquement dans l'endothélium des vaisseaux artériels et le récepteur EphB4 est exprimé spécifiquement dans l'endothélium des vaisseaux veineux [322-324]. L'éphrine-B2 continue à marquer sélectivement les artères durant le développement embryonnaire tardif et aussi chez l'adulte [302].

### 1.2.3 L'hémostase et la coagulation

L'hémostase et la coagulation sont une autre solution complémentaire à la vasoconstriction pour bloquer les pertes de sang [325]. La coagulation est le processus de formation du caillot de sang au site d'insulte vasculaire. La première étape est la formation d'un clou plaquettaire [325, 326]. Lorsque les plaquettes entrent en contact avec de l'endothélium lésé ou des composantes de la membrane basale (laminines, collagènes), leurs caractéristiques changent [325, 326]. Les plaquettes s'activent en réponse à plusieurs facteurs, comme l'ADP, la thrombine et le collagène [325, 326]. Les plaquettes activées augmentent de volume et développent des pseudopodes, ce qui favorise leur adhésion [325, 326]. Elles vont aussi développer une activité pro-coagulante par externalisation principalement de phosphatidylsérine et par la suite l'assemblage de complexes de la cascade de coagulation à la surface des plaquettes [327]. Les plaquettes relâchent également du PDGF, un facteur mitogène des CML, au site d'insulte vasculaire pour favoriser la réparation physiologique du tissu, mais à la suite d'insultes répétées, il pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose par son action mitogène sur les CML. C'est l'accumulation de plaquettes qui forme le clou plaquettaire [326]. Le clou est lâche, mais il se resserre avec l'accumulation des filaments de fibrines formés au cours du processus de coagulation [173, 325].

La cascade de coagulation est le processus par lequel une série de pro-enzymes sont activées de manière séquentielle ou des inhibiteurs d'enzymes sont

inactivés ce qui permet la génération d'une réponse d'amplification et la génération de fibrines pour renforcer le clou plaquettaire. Ce processus est catalysé par différentes substances chimiques appelées facteurs de coagulation. Le processus se développe en trois étapes. La première, soit l'activation de l'activateur de la prothrombine, peut survenir par deux voies formées de cascades d'activation de facteurs distincts menant aux mêmes résultats, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La deuxième est la conversion de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase et le  $\text{Ca}^{++}$ . Finalement, la troisième est la transformation du fibrinogène par la thrombine en fibrine soluble et la transformation de la fibrine soluble en insoluble par le facteur XIII, qui est activé par la thrombine [173, 325]. Ces deux voies sont la perspective classique de la cascade de coagulation, qui a permis l'interprétation du temps de coagulation. Mais, il est maintenant établi, que la génération ou l'exposition du TF au site de la blessure soit l'événement physiologique primaire qui initie la coagulation [328].

Comme tout système dans l'organisme, la coagulation possède son système opposé qui sert de régulateur, c'est la fibrinolyse. La fibrinolyse sert à dégrader la fibrine insoluble par la plasmine qui provient de l'activation du plasminogène, qui peut être attaché à la surface des fibrines ou libre dans le sang [329]. L'activation du plasminogène peut se faire par deux enzymes : soit t-PA ou u-PA [329]. La fibrinolyse comme bien des réactions peut aussi être inhibée de deux façons, par PAI-1, qui bloque l'activité de t-PA et u-PA, ou par l' $\alpha_2$ -antiplasmine, qui bloque l'activité de la plasmine [329].

## **1.2.4 Les maladies associées à une dysfonction de l'endothélium**

### **1.2.4.1 L'athérosclérose**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire qui se développe progressivement suite à l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères larges et moyennes. Lorsqu'il y a formation d'une plaque athérosclérotique, la rupture de cette plaque peut entraîner l'obstruction de l'artère, ce qui peut provoquer l'ischémie du cœur, du cerveau ou des extrémités. Plusieurs observations pathophysiologiques chez l'humain et l'animal ont mené à la formulation d'une hypothèse de réponse à l'insulte de l'athérosclérose, qui propose que la dénudation de l'endothélium soit la première étape dans l'athérosclérose [330]. Cependant, les versions plus récentes de l'hypothèse proposent maintenant une dysfonction de l'endothélium au lieu d'une dénudation [293].

Le développement de la lésion athérosclérotique se fait en plusieurs étapes subséquentes. La première étape de l'initiation est la dysfonction endothéliale. En accord avec l'hypothèse de la dysfonction endothéliale, les facteurs de risques classiques pour l'athérosclérose, comme les lipoprotéines de basses densités (LDL) oxydées (oxLDL) [331-333] et l'hyperglycémie [334], induisent l'apoptose des cellules endothéliales. L'apoptose endothéliale a été documentée chez les modèles

animaux d'athérosclérose [335]. L'apoptose stimule le développement d'un état prothrombotique et induit l'agrégation des plaquettes, qui produisent des facteurs de croissances et déstabilisateurs de l'homéostasie de la paroi vasculaire [190, 193]. Les changements précoces dans les vaisseaux athérosclérotiques sont caractérisés par une augmentation de molécules d'adhésion des plaquettes et une aggrégation, augmentation d'adhésion et activité de transmigration des monocytes à l'intérieur de la paroi des vaisseaux [293, 300]. Une augmentation de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 est observée aux sites d'insulte athérosclérotique [336, 337]. Des expériences avec des animaux déficients génétiquement ont confirmé le rôle clé de ces molécules d'adhésions dans le contrôle de l'adhésion des leucocytes mononucléaires aux sites d'insultes athérosclérotique et de remodelage vasculaire qui s'en suit [337-339]. Des souris transgéniques avec un niveau réduit des protéines VCAM-1 et ICAM-1 démontrent une réduction de la taille des lésions athérosclérotiques [336, 340], mais pas une disparition des lésions. Ces résultats suggèrent que les molécules d'adhésions jouent un rôle important, mais que d'autres molécules sont impliquées dans l'initiation du développement des lésions athérosclérotiques.

L'hyperhomocystéinémie est aussi un facteur de risque pour le développement de l'athérosclérose [293]. L'homocystéine semble provoquer une augmentation des ROS, principalement des anions superoxydes, et produire un effet délétère sur la vasculature [341]. Une conséquence de l'augmentation du niveau d'anions superoxydes est une inactivation du NO, qui entraîne une dysfonction endothéliale [341]. La captation des anions superoxydes par la superoxyde dismutase ou par le

4,5-dihydrobenzène 1,3-disulfonate (Tiron) peut renverser la dysfonction endothéliale dans des modèles animaux hyperhomocystémiques et dans des anneaux aortiques isolés exposés à l'homocystéine [342-344]. La dysfonction endothéliale induite par l'homocystéine peut aussi être renversée par l'augmentation de la concentration d'un antioxydant endogène, la glutathione, ou la surexpression de la glutathione peroxydase cellulaire dans des modèles animaux d'hyperhomocystéinémie [341].

Le stress mécanique causé par les fluides est aussi important et agit sur la morphologie des CE. Les cellules dans les régions tubulaires des artères, où le débit sanguin est uniforme, démontrent une forme ellipsoïde et sont alignées dans la direction du débit. Mais dans les régions de branches des artères ou de courbes, où le débit est troublé, les cellules ont une forme polygonale et pas d'orientation précise [300]. Ces dernières régions démontrent une perméabilité accrue aux macromolécules, comme les LDL et sont des sites préférentiels de formation de lésion athérosclérotique [345]. Un événement initiateur important de l'athérosclérose est l'accumulation de LDL dans la matrice sous-endothéliale. L'accumulation de LDL dans la matrice sous-endothéliale est le mécanisme de développement des lésions athérosclérotiques le mieux caractérisé [300]. Le oxLDL est pro-apoptotique pour les CE [331-333, 335, 346], ce qui amplifie la réaction inflammatoire en stimulant l'adhésion des monocytes sur les CE exprimant des molécules d'adhésions. Nous savons qu'une dysfonction de l'endothélium causée par une modification des CE, qui deviennent apoptotiques, peut provoquer l'expression de molécules d'adhésions. D'autres facteurs de risques de l'athérosclérose [293], comme la fumée

de cigarette et le diabète, peuvent aussi induire l'apoptose endothéliale [334, 347-349].

La deuxième étape de l'initiation du développement de la lésion athérosclérotique est l'épaississement myo-intimal par la prolifération et la migration des CML. Plusieurs évidences démontrent en effet que l'acquisition d'une résistance à l'apoptose et une augmentation de la prolifération chez les CML semblent nécessaire pour la formation de l'épaississement myo-intimal [350-356]. Une diminution de l'apoptose des CML et une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL ont été retrouvées chez les CML de la néo-intima dans des modèles murins de transplantation cardiaque [357], dans la formation de néo-intima secondaire à une angioplastie [350, 358], ou au placement d'un tube de polyéthylène [359] et au site d'épaississement myo-intimal dans les lésions athérosclérotiques chez l'humain [350]. Même si l'angioplastie est occasionnée par un stress mécanique plutôt que biologique, comme dans le cas de l'athérosclérose ou des MT, il n'en reste pas moins qu'elle se caractérise elle aussi par un épaississement myo-intimal et une dysfonction endothéliale [238]. Une augmentation de l'expression génique de molécules anti-apoptotiques, comme Bcl-xL chez les CML suite à une angioplastie, entraîne aussi une résistance à l'apoptose des CML [358]. L'injection d'anti-sens pour Bcl-xL contribue à une diminution de l'épaississement myo-intimal, à une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des CML, lors de transplantations cardiaques allogreffes chez la souris [357]. L'injection d'anti-sens de Bcl-xL dans l'artère carotide de lapin permet aussi d'augmenter l'apoptose des CML et la régression de lésion vasculaire [350].



Chez des souris déficientes en apoE<sup>-/-</sup>, une absence de p53 favorise le développement de l'épaississement myo-intimal [354]. Chez des veines en culture, la surexpression de p53 par adénovirus diminue la prolifération et la migration des CML et une réduction de l'épaississement myo-intimal associée à l'augmentation de l'expression de p53 [360]. Alors que le transfert du gène sauvage de p53 inhibe la formation néo-intimale en modulant la migration des CML et en augmentant l'apoptose [360]. La voie de signalisation des ERK 1/2 est un régulateur important de la croissance cellulaire et de l'apoptose [361]. Des études récentes démontrent qu'une augmentation de l'activité et de l'expression de ERK 1/2 est observée chez les CML dans des plaques athérosclérotiques *in vivo* chez le lapin, cependant cette augmentation peut être bloquée par l'utilisation du PD98059, un inhibiteur de ERK 1/2 [362]. L'apoptose endothéliale est un mécanisme commun associé à l'initiation de l'athérosclérose et des MT, cependant le remodelage vasculaire et l'épaississement myo-intimal, qui leur sont aussi associés, indiquent une régulation opposée chez les CML, soit une inhibition de l'apoptose.

En réponse à plusieurs stimuli, les CML de la média sont activées et la migration vers l'intima et la prolifération semblent être des étapes importantes dans le processus athérosclérotique. En fait, il est important de noter que les CML contractiles au repos ne peuvent migrer et proliférer à l'extérieur de la média sans une inhibition de p53 par des facteurs mitogéniques [363]. Des études chez des animaux avec une hypercholestérolémie induite artificiellement démontrent l'implication de la prolifération et la migration des CML et de la sécrétion de matrice (collagène et

protéoglycans) par les CML dans la formation des lésions athérosclérotiques [364-372]. Il est aussi important de mentionner que le PDGF, un facteur mitogénique des CML et relâché par les plaquettes activées, est un joueur important qui agit sur la prolifération et la migration des CML et sur l'épaississement myo-intimal. En effet par une thérapie d'oligonucléotides anti-sense, il a été démontré que l'inhibition de l'expression du récepteur PDGFR- $\beta$  réduit l'épaississement myo-intimal suite à une angioplastie de l'artère carotide chez le rat [373].

La chronicité de la lésion athérosclérotique passe par deux étapes. Premièrement, l'adhésion et la migration continues des monocytes médiées par les molécules d'adhésion et l'ingestion rapide des oxLDL par les monocytes transformés en macrophages, vont alors former des cellules spumeuses [300]. La mort des cellules spumeuses par nécrose vient contribuer à la formation du corps nécrotique, qui constitue une partie de la plaque [300]. Une prolifération continue de CML et la sécrétion de composantes de la matrice extracellulaire en trop grande quantité vont engendrer aussi une augmentation de la taille de la plaque [300]. En condition normale, un arrêt de la prolifération et un retrait des cellules se produit suite à la guérison de l'insulte, mais en absence d'un signal d'arrêt de prolifération ou la persistance d'un signal de réparation, on observe un épaississement myo-intimal. La plaque athérosclérotique va grossir vers l'adventice jusqu'à la limite de l'élasticité du vaisseau et par la suite la croissance se fera vers la lumière du vaisseau [374]. Finalement, la formation d'un thrombus peut survenir à la suite de la rupture de la plaque athérosclérotique [300]. Il existe donc plusieurs contextes cliniques qui se

caractérisent par une atteinte endothéliale et une accumulation de CML qui mène à un épaissement myo-intimal et un remodelage vasculaire. Cependant, c'est la persistance des dommages qui finit par provoquer un effet pathologique.

#### **1.2.4.2 Microangiopathie thrombotique**

La microangiopathie thrombotique (MT) est une des causes principales de l'insuffisance rénale aiguë et chronique chez les enfants [375, 376] et elle est aussi reconnue plus fréquemment en association avec la transplantation [377-381]. Un dommage intense à l'endothélium microvasculaire rénal caractérise la phase aiguë du syndrome [382]. La mort cellulaire endothéliale (apoptose et nécrose) de l'endothélium microvasculaire est acceptée comme un facteur central dans la pathophysiologie de la MT [190-193, 383, 384]. Le remodelage vasculaire avec l'accumulation de cellules musculaires lisses à l'intérieur de la microvasculature rénale caractérise les changements chroniques et est une forte indication du développement d'une défaillance rénale progressive [385-388]. Les mécanismes impliqués dans le remodelage microvasculaire chronique restent cependant largement non caractérisés.

Il est maintenant généralement accepté que l'apoptose des cellules endothéliales joue un rôle important dans la pathophysiologie des MT [383, 384, 389, 390]. La présence de cellules endothéliales apoptotiques a été identifiée dans des biopsies rénales de patients avec MT [391, 392] et le plasma de patient avec MT

induit l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* [389, 390]. Des travaux démontrent aussi que des facteurs associés cliniquement au développement de MT chez l'humain, comme la mitomycine C et la vérotoxine, induisent ou accentuent l'apoptose des CE *in vitro* [195, 393-396]. Finalement, plusieurs modèles animaux ont démontré une corrélation directe entre l'activation de l'apoptose des cellules endothéliales et le développement de MT [397-399].

La MT est un processus caractérisé par la formation de microthrombi à prédominance plaquettaire dans la microcirculation des organes affectés, et de manière prédominante au niveau de la microcirculation rénale [385, 400-405] menant à une microangiopathie anémique, une thrombocytopénie et un affaiblissement rénal. La MT se développe chez les jeunes enfants suite à une gastro-entérite causée par *E. coli O157:H7*, qui est une des causes majeures de dysfonction rénale aiguë chez les enfants [404, 406]. On reconnaît aussi la MT suite à une transplantation d'organes solides ou de moelle osseuse [379-381, 407-413].

Le suivi à long terme des patients qui ont eu une MT a révélé une augmentation de la fréquence de développement de dysfonction chronique rénale [382]. La MT est maintenant la première cause d'insuffisance rénale chronique chez les survivants à long terme de transplantation de moelle osseuse avec une incidence aussi haute que 71% chez certaines cohortes de patients [407, 409-413]. Le degré d'épaississement artériel intimal dans les biopsies rénales de patient développant une MT est un fort élément prédictif du développement graduel d'un échec rénal [190-193, 383, 384]. Ces changements au niveau de la paroi des vaisseaux semblent

s'expliquer par le développement d'une insulte endothéliale primaire suivit d'une thrombose, d'une exsudation intimale et de l'accumulation de cellules musculaires lisses [190-193, 383, 384]. La persistance ou la récurrence de ces événements formerait la base progressive d'une oblitération artérielle, qui ultimement mènerait à une insuffisance rénale terminale.

Une étude clinique avec biopsie chez des patients adultes souffrant de MT a démontrée plusieurs complications vasculaires dont la gravité peut être un indice de la survie du patient ou du niveau d'atteinte rénale [385]. La majorité des patients développent une hypertension suite à la MT [385]. Les biopsies révèlent aussi que les patients avec un bon pronostic (guérison ou dysfonction rénale chronique peu sévère) présentent un épaissement myo-intimal significativement moins important que le groupe avec un mauvais pronostic (mortalité ou hémodialyse) [385]. Selon l'analyse, il semble que la différence entre les lésions vasculaires des deux groupes soit occasionnée par des changements de coagulation intravasculaire, comme la formation de thrombus, la nécrose et la diminution de la lumière artérielle reliée à une prolifération intimale [385].

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du remodelage chronique microvasculaire dans les MT sont largement non caractérisés. Cependant, les similarités histologiques avec des maladies macrovasculaires chroniques comme l'athérosclérose, suggèrent qu'un mécanisme commun puisse être impliqué dans les deux cas. Les caractéristiques histologiques des lésions de MT consistent en un épaissement de la paroi des vaisseaux (capillaires et artérioles)

avec un gonflement et un détachement des CE de la membrane basale et l'accumulation de matériaux dans le sous-endothélium, suivie par l'accumulation de CML [414]. L'accumulation de cellules musculaires lisses à l'intérieur de la paroi vasculaire et l'augmentation de l'apoptose endothéliale dans l'initiation de l'insulte sont des caractéristiques communes partagées par les MT et l'athérosclérose.

### 1.2.5 La cyclosporine A

Les cyclosporines sont un groupe d'undécapeptides cycliques hydrophobiques avec un spectre divers d'activités biologiques [415]. Aujourd'hui, le membre le mieux caractérisé de ce groupe est la cyclosporine A (CsA) [415]. La CsA est un agent immunosuppresseur utilisé chez l'humain. Elle a été isolée d'un échantillon de sol contenant un champignon, le *Tolypocladium inflatum*, il y a plus de 25 ans [416]. L'élément important de la CsA et qui la différencie des autres molécules immunosuppressives est que son activité immunosuppressive affecte principalement les lymphocytes [417-419]. Elle a été introduite en 1983, comme un agent thérapeutique pour prévenir le rejet d'allogreffe rénale. La CsA est maintenant utilisée pour plusieurs applications thérapeutiques qui incluent la prévention du rejet de greffes de foie, de cœur, des poumons, de pancréas et de multiples transplantations d'organes [415].

La CsA s'attache avec beaucoup d'affinité aux cyclophilines [420, 421]. Les cyclophilines sont des protéines cytosoliques qui possèdent une activité peptidyle-

proline-*cis-trans* isomérase (PPIase) [422]. Liu et al. ont découvert en 1991 que le complexe cyclophiline-CsA, mais pas la cyclophiline seule, peut s'associer à une autre protéine cytosolique, la calcineurine [423]. La calcineurine, ou PP2B, appartient à une superfamille de protéine phosphatase sérine/thréonine, dont l'activité est régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline [424-426]. L'engagement des récepteurs de cellule T (TCR) avec leurs ligands induit une élévation des concentrations de calcium intracellulaire, qui active la calmoduline [427]. La calmoduline activée peut ensuite activer la calcineurine [427]. La calcineurine activée peut déphosphoryler les membres de la famille NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées), ce qui permet une translocation au noyau et l'activation de l'expression génique par des éléments-*cis* appelés NFAT [428-432]. En prévenant la déphosphorylation médiée par la calcineurine, la CsA inhibe la translocation nucléaire des membres de la famille NFAT et par conséquent l'expression génique des cellules T activées [427].

La CsA a aussi été rapportée comme jouant un rôle d'inhibiteur de l'apoptose dans une grande variété de types cellulaires [10], incluant les cellules endothéliales [433]. La CsA interagit avec la cyclophiline D, une protéine de la matrice mitochondriale associée à ANT, pour former un complexe capable d'inhiber l'activité de la calcineurine pour son activité immunosuppressive [434]. En interagissant avec la cyclophiline D, elle affecte le fonctionnement du PTP et inhibe la relâche du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytoplasme [435]. Cependant, la CsA a aussi été associée à l'induction de l'apoptose par la génération de stress oxydatif dans des cellules gliomales [436, 437]. Une augmentation de stress oxydatif a été démontrée dans des cellules endothéliales humaines et associée au développement de l'apoptose

[438], mais les techniques utilisées pour étudier l'apoptose ne permettaient pas de discriminer entre l'apoptose et la nécrose. La CsA augmente la formation d'anions superoxydes et de monoxyde d'azote dans des cellules endothéliales bovines, ce qui favorise la génération de peroxy-nitrite [439]. Il semble donc que la CsA ne possède pas seulement une activité anti-apoptotique, mais également pro-apoptotique.

Nous savons que l'utilisation de la CsA chez l'humain peut entraîner des complications comme des néphrotoxicités. La MT n'est pas commune, mais est connue comme une complication suite à une transplantation rénale. L'association avec la MT a été rapportée avant l'utilisation de routine de la CsA, mais la fréquence d'association a augmenté depuis que la CsA est utilisée de façon routinière dans les programmes d'immunosuppression [440]. Depuis, de nombreux groupes ont rapportés le développement de MT chez des patients receveurs de transplant de reins traités avec la CsA [441-448]. La néphrotoxicité de la CsA se manifeste donc par une maladie microvasculaire aiguë semblable à la MT, avec une dysfonction endothéliale et une fibrose [449]. La néphrotoxicité de la CsA a été associée au développement d'insulte endothéliale au niveau vasculaire artériel [450]. La néphrotoxicité aiguë de la CsA est normalement réversible avec l'arrêt de la thérapie [451]. Cependant, la différenciation entre une dysfonction rénale induite par la CsA et un rejet aigu nécessite une biopsie. Même s'il n'y a pas de changements pathologiques induits par la CsA, l'absence de rejet cellulaire ou vasculaire et la réversibilité de la dysfonction rénale avec l'arrêt de la drogue suggèrent fortement une néphrotoxicité de la cyclosporine [452, 453].



### 1.2.6 Le préconditionnement

À la différence de la vasoconstriction, de la coagulation et de l'angiogénèse, le préconditionnement est un moyen artificiel pour stimuler une résistance au stress dans la vasculature. C'est Murry et al. qui ont découvert le préconditionnement en 1986, dans un modèle canin d'ischémie du cœur [454]. Le préconditionnement, comme mode de conservation cellulaire, est induit par un premier stress (comme la chaleur, l'ischémie, le stress oxydatif ou la déprivation de facteurs de croissance) [455] qui permet l'activation d'une résistance à la mort cellulaire lors d'un second stress. Des études suggèrent très fortement que le cœur humain peut être préconditionné [456]. Le préconditionnement n'est pas exclusif au système cardiaque, même s'il est le plus étudié, mais il existe aussi dans d'autres modèles, comme le cerveau, les yeux, les reins, le foie et les muscles squelettiques [457]. Il permet de diminuer la taille de l'infarctus dans plusieurs modèles d'organes avec dommage par ischémie ou ischémie/réperfusion [458] et la protection de plusieurs organes durant la préservation avant la transplantation [459].

En fait, une variété de facteurs, qui sont relâchés suite aux conséquences des changements métaboliques et neuro-hormonaux qui surviennent durant l'ischémie/réperfusion, jouent un rôle dans le déclenchement de la phase de protection du préconditionnement ischémique. Plus spécifiquement, des manipulations moléculaires, biochimiques et pharmacologiques ont démontré un rôle des récepteurs à l'adénosine chez l'humain lors d'angioplastie [460-462], des

récepteurs opioïdes lors ischémie/réperfusion sur des coeurs de rats [463] et du monoxyde d'azote lors de carence en sérum dans une culture de cellules du neuroblastome humain [464] dans le déclenchement du préconditionnement. La transmission intracellulaire du signal activé par le stimulus de préconditionnement se fait par des modifications post-traductionnelles, principalement la phosphorylation, de protéines clés [465]. Plusieurs protéines kinases semblent donc être des éléments critiques pour la signalisation du système utilisé par le préconditionnement [465]. L'activation de la sérine/thréonine protéine kinase C (PKC) durant le stimulus de préconditionnement est à la fois nécessaire et suffisant pour la manifestation de la cardioprotection chez les lapins [466-468].

Il en existe environ une dizaine d'isoformes de la PKC [457]. Des études sur des coeurs de chien, de souris et de rats ont démontrées que la PKC $\epsilon$  démontre un phénotype cardioprotecteur important pour le préconditionnement ischémique [467, 469-472]. Les trois divisions des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), soit les ERK 1/2, les kinases c-Jun N-terminale (JNK) et la p38 MAPK (p38), sont considérées comme les médiateurs primaires de la réponse des myocytes aux stress [473]. Des événements répétitifs d'ischémie/réperfusion myocardique chez le lapin, qui induisent le préconditionnement, activent très fortement les ERK 1/2 et JNK, alors que l'activation de p38 est transitoire [474, 475]. Un des effecteurs induit, qui contribue à la cytoprotection induite par le préconditionnement, est la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) qui joue un rôle d'antioxydant contre les espèces réactives d'oxygènes induites par l'ischémie/réperfusion [476-

478]. L'inhibition par anti-sens de MnSOD prévient la cardioprotection chez le rat [477], alors que les souris surexprimants la MnSOD démontrent moins de sensibilité à l'ischémie/réperfusion [479]. Suite à un préconditionnement par la carence en sérum une induction de la synthèse de monoxyde d'azote induit une protection contre l'apoptose par une induction de Bcl-2 chez des cellules du neuroblastome [464]. L'activité protectrice du préconditionnement semble passer en partie par une protection de l'endothélium [458], mais les mécanismes impliqués dans la protection de l'endothélium sont encore mal défini contrairement aux mécanismes qui affectent les cardiomyocytes.

## **2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES**

## 2.1 Prémisses

- L'insulte endothéliale est généralement acceptée comme un événement initiateur crucial pour le remodelage vasculaire et plusieurs résultats suggèrent que l'apoptose endothéliale soit augmentée précocement aux sites d'insultes vasculaires.
- Plusieurs résultats démontrent que les facteurs de risques classiques pour l'athérosclérose et des maladies macrovasculaires fibroprolifératives chroniques (telle la dyslipidémie, hypertension et l'hyperglycémie) induisent l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.
- Des données récentes suggèrent aussi que l'apoptose des cellules endothéliales joue un rôle dans la physiopathologie des microangiopathies thrombotiques, une maladie microvasculaire de l'endothélium rénal associé à la formation de caillots plaquettaires et à un remodelage fibroprolifératif dans la phase chronique.
- Plusieurs résultats suggèrent qu'un déséquilibre entre les taux d'apoptose et de prolifération chez les différents constituants cellulaires de la paroi vasculaire joue un rôle important dans la pathophysiologie du remodelage

vasculaire, plus spécifiquement en augmentant la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses qui mène à l'épaississement myo-intimal.

- Les mécanismes responsables de la régulation opposée de l'apoptose des cellules endothéliales et vasculaires musculaires lisses aux sites d'insultes vasculaires sont encore aujourd'hui largement non caractérisés.
- Il est maintenant devenu évident que l'inhibition de l'apoptose ne mène pas forcément à la survie des cellules, mais peut rediriger le processus de mort cellulaire vers d'autres voies d'élimination des cellules.
- La cyclosporine A, un immunosuppresseur, possède aussi la capacité d'inhiber l'apoptose des cellules endothéliales, cependant son utilisation chez l'humain est associée à des complications vasculaires au niveau artériel du type des microangiopathies thrombotiques.

## 2.2 Hypothèses

- Nous formulons l'hypothèse que l'apoptose des cellules endothéliales n'est pas un processus de mort cellulaire silencieux, mais que les cellules endothéliales apoptotiques relâchent un ou des facteurs paracrins qui influencent l'homéostasie vasculaire en modifiant le microenvironnement local.
- Le ou les facteurs relâchés par les cellules endothéliales en conditions pro-apoptotiques peuvent représenter un mécanisme adaptatif pour l'induction d'une activité anti-apoptotique autocrine favorable sur les cellules endothéliales de manière à limiter l'insulte endothéliale et d'empêcher la généralisation de l'insulte à l'ensemble de l'arbre vasculaire.
- Le ou les facteurs relâchés par les cellules endothéliales en conditions pro-apoptotiques peuvent induire une activité anti-apoptotique et pro-proliférative paracrine sur les cellules musculaires lisses, ce qui entraînerait un remodelage vasculaire et un épaississement myo-intimal.
- L'inhibition de l'apoptose par la cyclosporine A des cellules endothéliales artérielles induit une autre voie de mort cellulaire.

## 2.3 Objectifs

- Vérifier que les cellules endothéliales en conditions pro-apoptotiques relâchent un ou des facteurs qui induisent une protection à l'apoptose, augmentent la prolifération et induisent l'angiogénèse des cellules endothéliales.
- Vérifier que les cellules endothéliales apoptotiques relâchent des médiateurs solubles qui induisent une protection à l'apoptose et la prolifération des cellules musculaires lisses.
- Vérifier que l'apoptose est nécessaire au relargage des médiateurs solubles par les cellules endothéliales en conditions pro-apoptotiques.
- Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité anti-apoptotique sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses conférées par les médiateurs solubles relâchés par les cellules endothéliales apoptotiques.
- Identifier les voies de signalisation impliquées dans l'activité anti-apoptotique sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses conféré par les médiateurs solubles relâchés par les cellules endothéliales apoptotiques.



- Effectuer la caractérisation biochimique du ou des médiateurs solubles anti-apoptotiques inconnus sur les cellules musculaires lisses relâchées par les cellules endothéliales apoptotiques.
- Vérifier que les composés identifiés par caractérisation biochimique ont une activité anti-apoptotique sur les cellules musculaires lisses.
- Confirmer que la Cyclosporine A inhibe l'apoptose des cellules endothéliales et identifier si une autre forme de mort cellulaire peut être induite chez les cellules endothéliales artérielles en réponse à cette inhibition par la cyclosporine A.
- Vérifier que les effecteurs classiques de l'apoptose ne sont pas impliqués dans la mort des cellules endothéliales artérielles induite par la cyclosporine A.
- Évaluer l'implication de différents effecteurs moléculaires, comme les espèces réactives d'oxygène, dans la mort des cellules endothéliales artérielles induite par la cyclosporine A.

### **3 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

### **3.1 ARTICLE NO. 1**

**Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporine A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells : regulation by reactive oxygen species and cathepsin D**

PAR

Marc-André Raymond, Luigina Mollica, Normand Vigneault, Anik Désormeaux,  
John S.D. Chan, Janos G. Filep et Marie-Josée Hébert

Publié dans

The FASEB Journal

Volume 17, 515-517 (2003)

**Avant propos :**

Nous savons que l'insulte endothéliale est généralement acceptée comme un événement initiateur crucial pour le remodelage vasculaire. En fait, une dysfonction de l'endothélium est associée avec l'initiation du développement de maladie vasculaire, comme l'athérosclérose et la microangiopathie thrombotique. Cependant, l'inhibition de l'apoptose ne semble pas résoudre le problème. La CsA, un agent immunosuppresseur, peut inhiber l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro*, mais son utilisation chez l'humain peut entraîner des complications qui mènent au développement de thrombus intra-rénaux semblables à ceux retrouvés chez les microangiopathies thrombotiques. Cependant, l'atteinte vasculaire engendrée par la CsA est artérielle et aucune étude *in vitro* n'a été effectuée sur l'effet de la CsA sur les cellules endothéliales artérielles. Dans le premier article de ce travail, nos résultats nous permettent de clarifier le débat en cours sur le rôle de la cyclosporine A (CsA) dans l'apoptose endothéliale. Nous confirmons ainsi le rôle anti-apoptotique de la CsA sur les cellules endothéliales artérielles (CEA) et apportons des évidences que la mort cellulaire induite par la CsA sur les CEA est une forme de mort cellulaire non-apoptotique avec les caractéristiques morphologiques de la nécrose sous contrôle moléculaire du stress oxydatif et de la protéine lysosomale cathepsine D. Cette forme de mort cellulaire serait potentiellement plus néfaste et plus hasardeuse pour l'intégrité des vaisseaux. L'inhibition de l'apoptose endothéliale ne doit donc pas être une solution pour prévenir tout dommage, mais l'apoptose par opposition à la nécrose pourrait être un avantage et être impliquée dans les mécanismes de gestion des dommages vasculaires. Il est possible que l'apoptose endothéliale joue un rôle

important dans la réparation et la limitation des dommages par un effet paracrin sur les cellules environnantes.

- Marc-André Raymond a contribué à l'élaboration intellectuelle du projet, à la planification expérimentale, au développement et la mise au point de nouvelles techniques de laboratoire et a effectués la majorité des expériences présentées dans l'article. En collaboration avec le Dr Marie-Josée Hébert, il a aussi participé à l'écriture du manuscrit.
- Luigina Mollica a effectué les premières expériences préliminaires de coloration en fluorescence au hoechst et à l'iodure de propidium et elle a aussi participé à la rédaction de l'article.
- Normand Vigneault a contribué aux expériences d'immunobavardage et aux expériences effectuées en cytométrie en flux.
- Anik Désormeaux a effectué les expériences de marquage au BrdU, ainsi que les contrôles positifs de nécrose, par la chaleur et le peroxyde, de coloration en fluorescence au hoechst et à l'iodure de propidium et au DIOC<sub>6</sub>.
- John S.D. Chan a contribué à l'élaboration de la stratégie de compréhension sur l'implication des espèces réactives d'oxygène et d'azote dans la mort induite par la cyclosporine A.

- Janos G. Filep a contribué à l'élaboration de la stratégie d'évaluation intracellulaire du stress des espèces réactives d'oxygène et d'azote induit cyclosporine A.

**Abstract**

Blockade of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) by cyclosporin A (CsA) inhibits apoptosis in various cell types. However, use of CsA in humans is associated with damage to the arterial endothelium. We evaluated whether inhibition of the apoptotic machinery by CsA promotes other forms of cell death in arterial endothelial cells (EC).

Exposure of human umbilical artery EC (HUAEC) to clinically relevant concentrations of CsA for up to 24 hours was associated with a significant increase in necrotic features. We detected inhibition of apoptosis and a significant increase in necrosis in HUAEC exposed concomitantly to CsA and mitomycin C, a pro-apoptotic DNA damaging agent. We found that CsA-induced cell death is independent of caspase activation, p53 induction and calcineurin inhibition. However, bongkreikic acid, another mPTP blocker, also increased necrosis in HUAEC. Dihydroethidium and acridine orange staining revealed increased intracellular production of reactive oxygen species (ROS) followed by lysosomal damage in HUAEC exposed to CsA. Hydroxyl radical and superoxide scavengers and inhibition of cathepsin D activity significantly attenuated CsA-induced EC death.

These results suggest that inhibition of the apoptotic machinery by CsA in arterial EC favors development of a necrotic form of cell death regulated by ROS and secondary lysosomal damage.

**Key words:** programmed cell death, endothelium, oxidative stress, lysosome.

## Introduction

Apoptosis is controlled at the mitochondrial level by sequestering a series of apoptogenic proteins, such as cytochrome c, Smac/DIABLO, Apoptosis inducing Factor (AIF) and endonuclease G in the mitochondrial intermembrane space and allowing cytosolic release of these factors upon exposure to pro-apoptotic signals [1, 2]. Mitochondrial membrane permeabilization allows cytosolic binding of cytochrome c with Apaf-1 and ATP, leading to formation of the apoptosome and downstream activation of effector caspases [1, 2]. Also, pro-apoptotic signals mediated by cell death receptors are amplified through mitochondrial translocation of Bid, which in turn facilitates cytosolic release of cytochrome c and Smac/DIABLO, and caspase activation [1, 3-5]. Hence, the mitochondrion is appreciated as a central integrator of pro-death stimuli, streamlining various types of pro-apoptotic signals into a common caspase-dependent pathway [2].

Blockade of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) by cyclosporin A (CsA) inhibits mitochondrial membrane permeabilization and suppresses apoptosis in a wide array of cell types [6], including endothelial cells [7]. However, use of CsA in humans is characteristically associated with development of endothelial injury in the arterial vasculature [8]. Mounting evidence suggests that blockade of the apoptotic machinery does not translate into cellular protection against all forms of cell death [9, 10]. Instead it might reveal or even enhance underlying back-up death programmes [9-11]. Hence, we evaluated whether inhibition of the



apoptotic machinery by CsA promotes non-apoptotic forms of cell death in arterial endothelial cells (EC).

We used a fluorescence microscopy strategy we validated previously [12-14] to evaluate concomitantly development of early and late apoptotic features and primary necrosis in human endothelial cells (EC) in vitro exposed to CsA. Also, we studied arterial endothelial cells to reflect the characteristic arterial cytotoxicity associated with use of CsA in humans. We report that CsA, while inhibiting apoptosis of arterial EC, favors development of a form of cell death that bears the morphological and biochemical characteristics of necrosis. Classical regulators of apoptosis are not activated during this form of cell death. Finally, we describe novel molecular regulators for CsA-induced necrosis and suggest that this type of cell death represents a non-apoptotic yet programmed form of cellular demise.

## **Methods**

### ***Culture of endothelial cells***

Human umbilical artery endothelial cells (HUAEC) were purchased from Clonetics (San Diego, CA) and used at passages 2 up to 4. The cells were seeded on gelatin-coated (1%) tissue culture plates (Becton-Dickinson, NJ, USA) and cultured in EGM-MV (Clonetics, CA) and maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. Monolayers of confluent HUAEC were exposed to various agents for the indicated period of time. At the end of the incubation period, HUAEC were subjected to one of the following techniques.

### ***Viability assays and assessment of proliferation***

Viability of adherent cells was evaluated with crystal violet staining as we described previously [14, 15]. In brief, HUAEC were grown in gelatinized 96-well plates and exposed to the various experimental conditions. At the end of the incubation period, 10 µl of 0.75% crystal violet/ 30% acetic acid was added to 100 µl of medium/well. The plates were washed, allowed to dry and the absorbance of each well, which is proportional to the amount of viable cells per well, was read at 550 nm with a LP400 Microplate Reader (Diagnostics Pasteur). Measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis was performed in sub-confluent HUAEC using Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer and as we described previously [14].

### ***Screening for apoptosis and necrosis by fluorescence microscopy***

For assessment of apoptosis and necrosis we used fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilised endothelial cells stained with Hoechst 33342 and propidium iodide as described in our previous work [12-14]. We showed that this technique accurately differentiates early apoptotic, late apoptotic and primary necrotic cells and is more accurate for evaluation of apoptosis than TUNEL assays [12-14, 16]. In brief, HUAEC were grown to confluence in 24-well gelatinized polycarbonate culture plates (Becton-Dickinson, NJ, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Following exposure to the various experimental conditions, Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) was added (1µg/ml for 10 min at 37°C). To prevent further uptake of Hoechst (HT), cells were washed with Phosphate-buffered saline (PBS). Propidium iodide (PI) was added to each sample to a final concentration of 5 µg/ml, immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter  $\lambda = 360-425$  nm). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dish were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

Viable cells display normal nuclear and cytoplasmic morphology and stain blue. Early apoptotic cells are characterized by cell shrinkage, nuclear condensation and preservation of plasma membrane integrity. Chromatin condensation is associated with enhanced fluorescence for HT (bright blue) whereas preservation of cell membrane integrity precludes PI staining. Late apoptotic cells (also called

secondary necrosis) are characterized by presence of characteristic apoptotic nuclear changes and loss of cell membrane integrity associated with PI staining. Primary necrotic cells are characterized by increased cell size, absence of chromatin condensation and rapid disruption of cell membrane integrity. Hence these cells show increased nuclear size, absence of chromatin condensation and positive PI staining, the latter being a read-out of loss of cell membrane integrity [12-14]. Hence both primary and secondary necrotic cells may stain red with PI, but nuclear morphology differentiates the underlying mechanism of cell death.

#### ***Evaluation of the intracellular ATP/ADP ratio***

Measurement of ATP/ADP ratios was performed using the ApoGlow kit from Bio Whittaker (CA, USA) according to the protocol provided by the manufacturer. In brief, HUAEC were grown to confluence in 96-well plates and exposed to experimental conditions for up to 24 hours. At the end of the incubation, cells were treated with the Nucleotide Releasing Reagent for 5 minutes followed by addition of the Nucleotide Monitoring Reagent and measurement of ATP content using a luminometer (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Australia). After 10 minutes, ADP Converting Reagent was added to the extract (Background), incubated for 5 minutes and a last reading for ADP content was taken. The ATP/ADP ratio is calculated according to the following equation:  $ATP / (ADP - Background)$ .

#### ***Evaluation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) with $DIOC_6(3)$ staining***

For assessment of  $\Delta\Psi_m$  we used fluorescence microscopy of endothelial cells stained with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DIOC<sub>6</sub>(3)) (Molecular Probes, USA) and PI as described previously [17]. DIOC<sub>6</sub>(3) is a lipophilic cationic dye trapped in mitochondria in presence of a normal  $\Delta\Psi_m$  whereas loss of  $\Delta\Psi_m$  leads to cytosolic release of DIOC<sub>6</sub>(3) and loss of fluorescence intensity. In brief, HUAEC were grown to confluence in 24-well gelatinized polycarbonate culture plates (Becton-Dickinson, NJ, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Following exposure to the experimental conditions, HUAEC were incubated with DIOC<sub>6</sub>(3) (0,2  $\mu$ M) for 20 min at 37°C. Cells were washed once with PBS + Ca, Mg with 0,1% bovine serum albumin (BSA), then incubated for a further 40 min. in PBS + Ca, Mg with 0,1% BSA at 37°C. PI was added to each sample to a final concentration of 5  $\mu$ g/ml, immediately before fluorescence microscopy analysis.

#### ***Immunoblotting for p53, caspase-1 and caspase-8***

After 24 hours of incubation in experimental conditions, HUAEC were harvested by scraping in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 20  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.2 units/ml aprotinin, 0.025% sodium azide and 0.1% PMSF). Cell-extracts were centrifuged (30 min., 4°C, 10 000g) and supernatants were analyzed. Samples containing 50 to 100  $\mu$ g of proteins were separated on a 12% polyacrylamide gel and transferred to a nylon-supported nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). The membrane was blocked with Tris-buffered saline (TBS) + 3% non-fat milk for 60 minutes at room temperature, followed by overnight

incubation at 4°C with a monoclonal anti-p53 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA), an anti-caspase-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA), an anti-caspase 8 antibody (kind gift of Dr. R. Bertrand, CRCHUM, University of Montreal) or with a monoclonal anti-actin antibody (Cedarlane, Ont. Canada). The membrane was then washed three times with TBS, incubated with a horseradish peroxidase-labeled secondary antibody for one hour (Biosource International) and washed again three times in TBS + Tween 0.05%. Signal was visualized with enhanced chemiluminescence (Life technologies Inc.) by exposing the membrane to film.

#### ***Caspase inhibition studies***

For inhibition of caspase-3 activity, HUAEC were grown to confluence in 96-well plates. DEVD-CHO (Calbiochem, USA) at a final concentration of 10  $\mu$ M or vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) resuspended in normal medium were added to each well and incubated for 2 hours at 37°C. Medium was then removed and HUAEC incubated in the various experimental conditions for 24 hours, followed by evaluation of apoptosis and necrosis with HT and PI staining.

#### ***Evaluation of intracellular concentrations of reactive oxygen species, peroxynitrite and nitric oxide***

To assess intracellular formation of reactive oxygen species, peroxynitrite and nitric oxide, HUAEC were loaded with dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes, USA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123) (Molecular Probes, USA) and 4,5-diaminofluorescein/diacetate (DAF-2/DA) (Molecular Probes, USA) respectively as

described [18, 19]. In brief, HUAEC, grown to confluence in 6-well gelatin-coated polycarbonate culture plates were loaded for 30 min. with non-limiting concentration of DHE (5 $\mu$ M), DHR 123 (10 $\mu$ M) and DAF-2/DA (5 $\mu$ M). HUAEC were then exposed to the various experimental conditions for 1, 3 or 6 hours, washed with PBS, centrifuged and resuspended in PBS (4°C) before immediate analysis. Flow cytometry analysis was carried out with a VANTAGE SE flow-cytometer (Becton-Dickinson, USA) equipped with an ion argon laser, using excitation wavelength of 488nm. Fluorescence emission signals were collected with a 525 nm band pass filter in the cases of DHR 123 and DAF-2/DA and with 575 nm band pass filter for DHE. Fluorescence signals were collected with logarithmic amplifiers.

#### ***Evaluation of lysosomal damage with acridine orange***

Lysosomal damage, was assessed by fluorescence microscopy following staining with acridine orange (AO) (Calbiochem, USA) as described [20-22]. AO is a metachromatic fluorophore and accumulates in the acidic vacuolar apparatus, preferentially in secondary lysosomes, due to proton trapping. It shows red fluorescence when trapped in lysosomes and green fluorescence after cytosolic relocalisation, when excited with blue light.

In brief, HUAEC were loaded with AO (Calbiochem, USA) (5 $\mu$ g/ml for 15 min at 37°C) then exposed to the various experimental conditions for up to 16 hours. The cells were washed once with PBS+ Ca, Mg with 0,1% BSA and evaluated with fluorescence microscopy (excitation filter  $\lambda$  = 420-490 nm). The percentages of

adherent HUAEC with normal or destabilized lysosomes were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

### ***Reagents***

All reagents were purchased from Sigma Chemicals (USA) unless stated otherwise. Cyclosporin A (CsA) was purchased from Novartis Pharma Canada. Tacrolimus was purchased from Fujisawa Canada. Bongkreikic acid and ALLN were from Calbiochem, USA. ZFA-FMK was from R and D Systems, USA.

### ***Statistical analysis***

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using Student's T-test with Bonferoni corrections for multiple comparisons. A P value of  $< 0.05$  was taken to represent a statistically significant difference between group means.



## Results

### **Cyclosporin A inhibits apoptosis and increases necrosis in arterial endothelial cells.**

Exposure to CsA (1 to 100 ug/ml) for 6 to 24 hours (Figure 1A) significantly decreased the viability of HUAEC (Figure 1A). Using Hoechst 33342 (HT) and propidium iodide (PI) staining we found a significant increase in the percentage of cells bearing the morphological features of necrosis in HUAEC exposed to CsA (1 and 10 ug/ml) for 24 hours without changes in the percentage of apoptotic cells (Figure 1 C and E). Mitomycin C (MMC), a DNA damaging agent, significantly increased the percentage of apoptotic cells without increasing necrosis (Figure 1 C and E). Concomitant exposure to MMC and CsA significantly inhibited apoptosis as compared with MMC alone but significantly increased necrosis (Figure 1 C and E) in HUAEC. Necrotic cells were characterized by cell and nuclear swelling, absence of chromatin condensation and loss of cell membrane integrity as indicated with positive PI staining. Presence of nuclear condensation associated with loss of cell membrane integrity, suggestive of late apoptotic cell death, was extremely uncommon.

To further evaluate the characteristics of endothelial cell death developing in presence of CsA we measured ATP/ADP ratios in HUAEC exposed to CsA, MMC or both for up to 24 hours. Decreased ATP/ADP ratios were found in HUAEC exposed to CsA alone for 24 hours whereas ATP/ADP ratios were not decreased in HUAEC exposed to MMC alone (Figure 1D). Concomitant exposure to CsA and MMC for 16

and 24 hours was associated with decreased ATP/ADP ratios (Figure 1D), again suggesting that CsA, in presence of a pro-apoptotic stimulus, redirects development of cell death towards necrosis.

Mitochondrial function was further evaluated using DIOC<sub>6</sub>(3) staining concomitantly with PI staining. In normal cells, DIOC<sub>6</sub>(3) staining led to a finely mitochondrial reticular pattern whereas PI staining was absent (Figure 1E). Perinuclear relocalisation of DIOC<sub>6</sub>(3) staining was found in HUAEC exposed to MMC, yet cell membrane integrity was maintained and these cells effectively exclude PI (Figure 1E). In HUAEC exposed to CsA, necrotic cells showed either diffuse DIOC<sub>6</sub>(3) cytoplasmic staining or loss of DIOC<sub>6</sub>(3) staining in association with positive PI staining. Loss of mitochondrial function was also found in necrotic HUAEC exposed concomitantly to CsA and MMC (Figure 1E). Representative micrographs of HUAEC exposed to two different pro-necrotic positive controls (heating at 65°C and exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) show staining patterns similar to that observed in HUAEC exposed to CsA (Figure 1E).

Hence, these results suggest that exposure to CsA induces a necrotic response in normal arterial endothelial cells and, upon induction of DNA damage, shifts development of cell death from apoptosis to primary necrosis.

**Classical effectors of apoptosis are not involved in endothelial cell death induced by cyclosporin A**

To further support our contention that CsA induces a non-apoptotic form of cell death, we studied the importance of apoptosis-regulating pathways in CsA-induced EC death. We found increased p53 protein levels in HUAEC exposed to MMC, whereas p53 protein levels were not increased in presence of CsA (Figure 2A). Pre-incubation with DEVD-CHO, an inhibitor of caspase-3, did not inhibit necrosis in HUAEC exposed to CsA whereas it significantly reduced apoptosis induced by MMC (Figure 2B).

**Caspases implicated in regulation of non-apoptotic programmed cell death are not activated during necrosis induced by cyclosporin A**

Activation of caspase-8 and caspase-1 has been recently implicated in regulation of non-apoptotic programmed cell death [23-26]. However, we found no evidence of caspase-1 or caspase-8 activation in HUAEC exposed to CsA, MMC or both for 24 hours (Figure 2C). These results suggest that caspase-1 and caspase-8 activation is not implicated in regulation of CsA-induced necrosis and confirm previous observations suggesting that DNA-damage-induced apoptosis occurs in absence of caspase-1 and caspase-8 cleavage [2].

**Evidence that reactive oxygen species and subsequent lysosomal damage act as molecular regulators of cyclosporin-induced endothelial necrosis**

We evaluated whether calcineurin activity or function of the mitochondrial adenine nucleotide translocator (ANT), two pathways known to be inhibited by CsA,

could be implicated in regulation of CsA-induced EC death. Tacrolimus, another calcineurin inhibitor, (used at equipotent concentrations for calcineurin inhibition [27, 28]) did not induce death (either necrosis or apoptosis) of HUAEC and did not accentuate endothelial necrosis induced by DNA damage (Figure 3A). Bongkrekic acid, a ligand and inhibitor of ANT, used within concentrations reported to inhibit apoptosis [29], also induced necrosis in HUAEC (Figure 3B), suggesting that blockade of ANT per se predisposes to development of non-apoptotic cell death in HUAEC.

We then tested the role of reactive oxygen radicals as potential regulators of CsA-induced necrosis. Flow cytometry analysis of HUAEC stained with DAF-2/DA, DHE or DHR 123 showed that exposure to CsA is associated with a dose-dependent increase in intracellular nitric oxide content, followed by increased superoxide and peroxynitrite production (Figure 4 and 5). We found a different pattern in response to the pro-apoptotic stimulus : in presence of MMC, HUAEC did not generate nitric oxide nor peroxynitrite and generation of superoxide occurred at later time points and was of lesser magnitude. Superoxide dismutase, 1,3-dimethyl-2-thiourea (1,3 DT), a hydroxyl radical scavenger and tiron a scavenger of superoxide and hydroxyl radicals significantly attenuated CsA-induced cell death (Figure 5B). However, uric acid, a scavenger of peroxynitrite failed to attenuate CsA-induced cell death in HUAEC whereas L-NAME significantly increased development of CsA-induced cell death (Figure 5B). These results suggest that reactive oxygen radicals, generated upon exposure to CsA, activate pro-necrotic pathways in arterial endothelial cells, whereas nitric oxide and peroxynitrite do not.

We also evaluated the importance of lysosomal damage in CsA-induced necrosis using acridine orange staining. In HUAEC, lysosomal dysfunction peaked after 16 hours of exposure to CsA (Figure 5C) whereas shorter exposures were not associated with significant lysosomal dysfunction (data not shown). Exposure to MMC, a pro-apoptotic stimulus, did not induce lysosomal damage (Figure 5C). Tiron significantly attenuated development of CsA-induced lysosomal damage (Figure 5C). Pepstatin A, an inhibitor of cathepsin D activity, significantly decreased CsA-induced endothelial cell death whereas inhibition of cathepsin B and L with ZFA-FMK and ALLN did not (Figure 5D). These results suggest that reactive oxygen radicals generated upon exposure to CsA are pivotal regulators of pathways leading to lysosomal damage and ultimately necrosis.

## Discussion

In the last decade, inhibition of key components of the apoptotic machinery with biochemical inhibitors or germ-line knock-out has revealed the presence of back-up death programmes [9, 11]. Although strong evidence is accumulating for programmed cell death occurring independent of classical effectors of apoptosis, the molecular identity of their mediators and their level of cooperation remains to be elucidated.

CsA binds cyclophilin D, a mitochondrial matrix protein associated with the ANT [30], and thus prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis in a wide variety of cell types [6, 31] including endothelial cells [7]. However, use of CsA in humans is characteristically associated with development of endothelial injury in the arterial vasculature [8]. In the present paper we provide evidence that inhibition of the apoptotic machinery by CsA activates non-apoptotic forms of cell death in endothelial cells. We used a fluorescence microscopy strategy we validated previously [12-14] to evaluate concomitantly necrosis and the various stages of apoptosis in human endothelial cells exposed to CsA *in vitro*. We quantified the various types of cell death in adherent endothelial cells to avoid the possibility that trypsinization alters cell membrane integrity and falsely increases propidium iodide staining. We used arterial endothelial cells to reproduce the characteristic arterial cytotoxicity associated with use of CsA in humans. Also, we tested the impact of CsA on endothelial cell death using clinically-relevant concentrations. A large body of evidence shows that trough levels of CsA do not adequately evaluate

systemic exposure to CsA in humans [27, 32]. Hence, doses of CsA are now adjusted in humans based on the area under the concentration time-curve (AUC), which approximates a patient's total exposure to cyclosporin over a dosage interval [27, 32]. AUC-CsA concentrations of 1 to 5 ug/ml are recommended in the immediate post-transplant period whereas concentrations in range of 0.6 to 1 ug/ml are recommended thereafter [27]. Hence we evaluated the impact of CsA on arterial endothelial cell death using concentrations ranging from 1 to 10 ug/ml.

We report that CsA, while inhibiting apoptosis, does promote development of a form of cell death that bears the morphological and biochemical characteristics of primary necrosis i.e. cell and nuclear swelling, absence of chromatin condensation, loss of cell membrane integrity, loss of mitochondrial membrane potential and decreased ATP/ADP ratio. Concomitant exposure of HUAEC to CsA and a pro-apoptotic stimulus inhibited development of apoptosis but increased necrosis. Hence exposure to CsA in presence of a pro-apoptotic stimulus did not improve endothelial viability, rather it redirected cell death towards necrosis.

Our results also show that classical regulators of apoptosis are not implicated in the pathways that govern CsA-induced necrosis. More specifically, p53 was not induced in HUAEC exposed to CsA whereas exposure to MMC significantly increased p53 protein levels. Biochemical inhibition of caspase-3, the main effector caspase, did not prevent CsA-induced necrosis whereas it significantly inhibited apoptosis secondary to DNA damage.

Caspase-8 activation occurs in association with death receptor ligation and activation of the extrinsic pathway of apoptosis [2] whereas caspase-1 functions predominantly in cytokine maturation [33]. Yet both caspases were recently implicated in regulation of non-apoptotic forms of programmed cell death [9, 23-26] and hence were also considered as possible effectors of CsA-induced endothelial necrosis. We found no evidence of caspase-8 or caspase-1 processing in HUAEC exposed to CsA for up to 24 hours. Also, as expected, caspase-1 and caspase-8 were not cleaved in HUAEC exposed to MMC, since the DNA damage apoptotic response is known to be largely dependent on intrinsic activation of apoptosis [2]. Hence our results suggest that CsA-induced necrosis is largely regulated by caspase-independent pathways.

As CsA is a potent calcineurin inhibitor, we evaluated whether calcineurin inhibition regulates development of necrotic features. Tacrolimus, another calcineurin inhibitor did not induce necrosis suggesting that CsA-induced is independent of calcineurin inhibition. We also considered the possibility that blockade of ANT by CsA could be implicated in the activation of pro-necrotic pathways. Bongkrekic acid, another inhibitor of ANT [31], also induced necrosis of HUAEC, suggesting that inhibition of the activity of ANT predisposes to development of non-apoptotic forms of cell death.

Reactive oxygen and nitrogen species have been implicated in regulation of apoptotic and non-apoptotic cell death [9, 11] and CsA has recently been shown to induce production of reactive oxygen radicals and peroxynitrite in bovine endothelial



cells [18]. Hence, we investigated the importance of oxidative and nitrosolic stress in the regulation of CsA-induced cell death. CsA evoked rapid increases in NO and reactive oxygen formation followed by delayed increases in peroxynitrite formation by HUAEC. Scavengers of superoxide and/or hydroxyl radicals significantly decreased CsA-induced endothelial cell death whereas scavengers of peroxynitrite did not. Inhibition of NO synthase with L-NAME significantly increased CsA-induced cell death. These results indicate a direct role for reactive oxygen species in the development of CsA-induced necrosis, whereas NO may serve as a buffer system for reactive oxygen radicals. It is possible that NO scavenges superoxide through formation of peroxynitrite, which would then react with glutathione to form nitroso-glutathione, a NO donor molecule [34]. Thus, an increased peroxynitrite formation may not necessarily induce cytotoxicity as suggested [18] provided that sufficient amounts of intracellular glutathione are present. Hence, decreased NO formation would increase the ratio of intracellular reactive oxygen species to NO and lead to enhanced cell death.

Evidence of lysosomal damage and activation of lysosomal proteases following oxidative stress has been reported in apoptosis and necrosis [9, 35, 36]. We found that production of reactive oxygen species precedes development of lysosomal damage and that scavengers of reactive oxygen radicals prevent both development of lysosomal damage and CsA-induced cell death. Also, pepstatin A, an inhibitor of cathepsin D activity, significantly decreased CsA-induced endothelial cell death. Hence, CsA-induced necrosis retains the character of a program in the sense that

selective biochemical inhibitors can block CsA-induced cell death without interfering with the initial triggering event.

Our findings shed light on the molecular mechanisms that govern CsA-induced endothelial cell death and suggest that oxidative stress is a pivotal initiating event leading to induction of lysosomal damage and activation of a necrotic form of programmed cell death. Also, our results help resolve an ongoing debate on the role of CsA on endothelial apoptosis, as contradictory results have been reported [7, 37-39]. Using various methods to clearly discriminate the various stages of apoptosis from necrosis, we confirmed the anti-apoptotic activity of CsA and provide conclusive evidence that CsA-induced cell death is a non-apoptotic form of cell death bearing the morphological characteristics of necrosis yet under molecular regulation by oxidative stress and the lysosomal protease cathepsin D. Finally, our results suggest novel pathways that could be inhibited for prevention of CsA-induced endothelial damage.

## Acknowledgments

This work was supported by operating grants to MJH from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant # mt-15447) and the Kidney Foundation of Canada. MJH is a scholar of the CIHR. We thank the Fondation J. Lévesques and the Fondation CHUM for their support in providing the equipment necessary to conduct this work.

Address requests for reprints to:

Marie-Josée Hébert, M.D.

CRCHUM, labo y-3624

1560 Sherbrooke est

Montréal, QC

H2L 4M1

Canada

Phone: (514) 890-8000 ext. 25393

Fax: (514) 412-7661

E-mail: [marie-josee.hebert.chum@ssss.gouv.qc.ca](mailto:marie-josee.hebert.chum@ssss.gouv.qc.ca)

## References

- 1 Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Dev* 15, 2922-2933
- 2 Ferri, K.F. and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 3, E255-E263
- 3 Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., S, A.E. and Hajnoczky, G. (2002) Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* 277, 5651-5659
- 4 Tafani, M., Karpinich, N.O., Hurster, K.A., Pastorino, J.G., Schneider, T., Russo, M.A. and Farber, J.L. (2002) Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 277, 10073-82
- 5 Kuwana, T. (1998) Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273, 16589-16594
- 6 Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619-42
- 7 Walter, D.H., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (1998) Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 98, 1153-1157
- 8 de Mattos, A.M., Olyaei, A.J. and Bennett, W.M. (2002) Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 35, 333

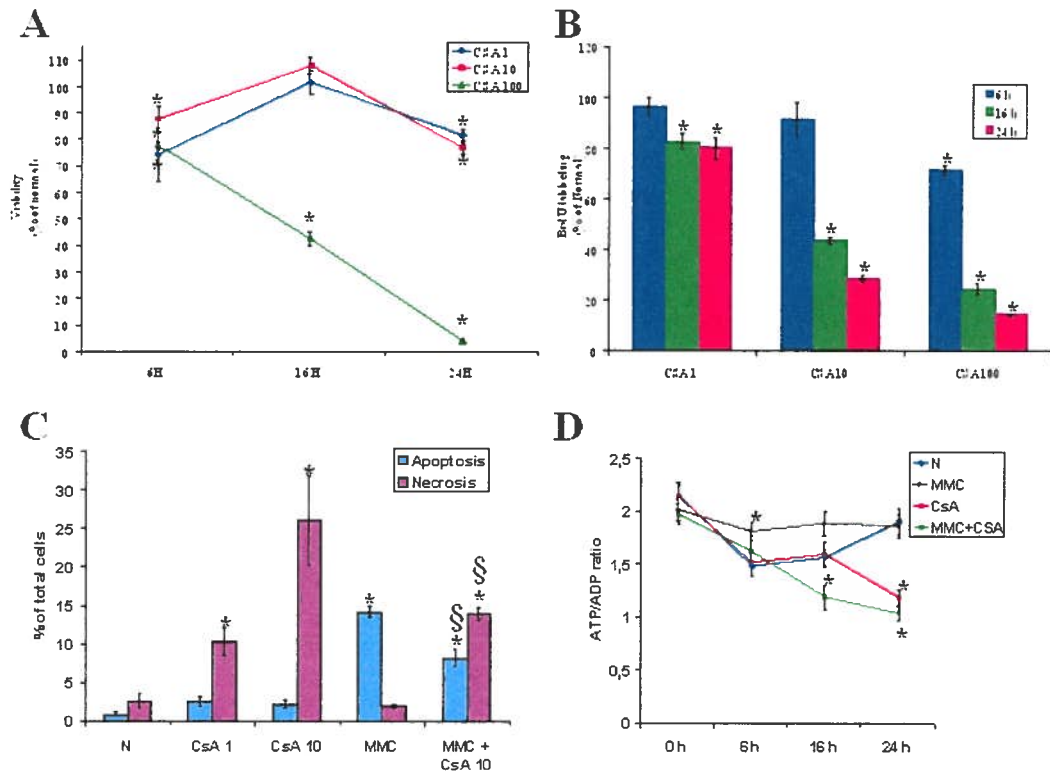
- 9 Leist, M. and Jäätelä, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2, 1-10
- 10 Wyllie, A.H. and Golstein, P. (2001) More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11-13
- 11 Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. and Golstein, P. (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967-970
- 12 Hébert, M., Takano, T., Holthofer, H. and Brady, H. (1996) Sequential morphological events during apoptosis of human neutrophils. *J Immunol* 157, 3105-15
- 13 Hébert, M., Gullans, S., Mackenzie, H. and Brady, H. (1998) Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an IL-1B dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 152, 523-32
- 14 Raymond, M.A., Vigneault, N., Luyckx, V. and Hébert, M.J. (2002) Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 291, 261-269
- 15 Santos, B., Chevaile, A., Hébert, M., Zagajeski, J. and Gullans, S. (1998) A combination of NaCl and urea enhances survival of IMCD cells to hyperosmolality. *A J Physiol* 274, F1167-73
- 16 Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21, 1465-1468

- 17 Rottenberg, H. and Wu, S. (1997) Mitochondrial dysfunction in lymphocyte from old mice: enhanced activation of the permeability transition. *Biochem Biophys Res Com* 240, 68-74
- 18 Navarro-Antolin, J., Lopez-Munoz, M.J., Klatt, P., Soria, J., Michel, T. and Lamas, S. (2001) Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J* 15, 1291-1293
- 19 Filep, J.G., Beauchamp, M., Baron, C. and Paquette, Y. (1998) Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161, 5656-5662
- 20 Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. and Brunk, U. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* 359, 335-43
- 21 Daré, E., Li, W., Zhivotovsky, B., Yuan, X. and Ceccatelli, S. (2001) Methylmercury and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Rad Biol Med* 30, 1347-1356
- 22 Antunes, F., Cadenas, E. and Brunk, U.T. (2001) Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 356, 549-555
- 23 Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W. and Vandenameele, P. (1998) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188, 919-30
- 24 Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y. and Nagata, S. (1998) Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 1998 143, 1353-60

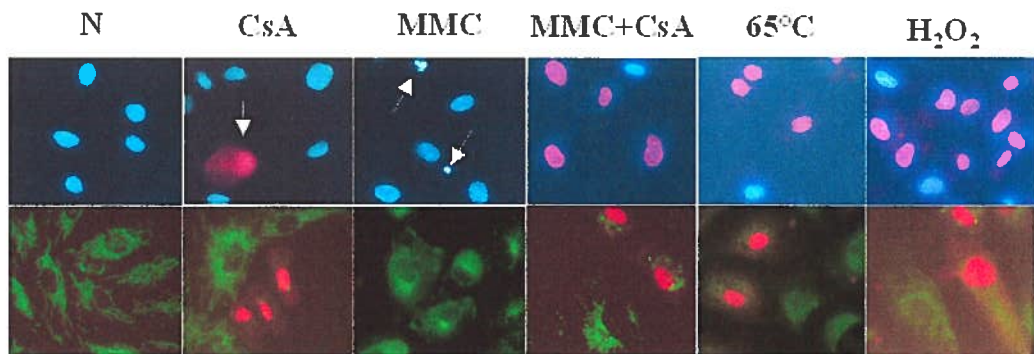
- 25 Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-95
- 26 Boise, L.H. and Collins, C.M. (2001) Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol* 9, 64-67
- 27 Armstrong, V.W. and Oellerich, M. (2001) New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 34, 9-16
- 28 Kung, L. and Halloran, P.F. (2000) Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* 70, 327-335
- 29 Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184, 1155-1160
- 30 Halestrap, A.P., Doran, E., Gillespie, J.P. and O'Toole, A. (2000) Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28, 170-177
- 31 Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312
- 32 Mahalati, K., Belitsky, P., West, K., Kiberd, B., Fraser, A., Sketris, I., Macdonald, A.S., Mcalister, V. and Lawen, J. (2001) Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 12, 828-833

- 33 Nicholson, D.W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-816
- 34 Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Goodwin, D.A., Nicholas, R.G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M.W. and Moncada, S. (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6702-6706
- 35 Leist, M. and Jäättelä, M. (2001) Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Diff* 8, 324-326
- 36 Kagedal, K., Johansson, U. and Öllinger, K. (2001) The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 15, 1592-1594
- 37 Esposito, C., Fornoni, A., Cornacchia, F., Bellotti, N., Fasoli, G., Foschi, A., Mazzucchelli, I., Mazzullo, T., Semeraro, L. and Dal Canto, A. (2000) Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial, and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 58, 123-130
- 38 Kochi, S., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., Naito, M., Tsuruo, T. and Sawada, Y. (2000) Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus. *Life Sci* 66, 2255-2260
- 39 Longoni, B., Boschi, E., Demontis, G.C., Ratto, G.M. and Mosca, F. (2001) Apoptosis and adaptive responses to oxidative stress in human endothelial cells exposed to cyclosporin A correlate with BCL-2 expression levels. *FASEB J* 15, 731-740



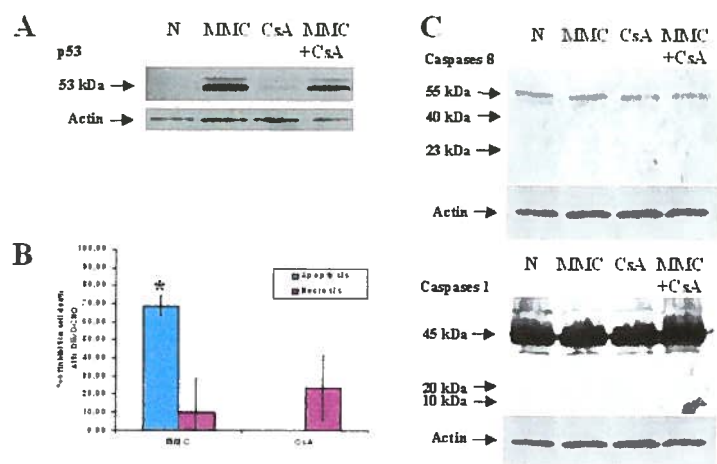


**E**



**Figure 1. Cyclosporin A protects against apoptosis, but enhances necrosis of HUAEC.**

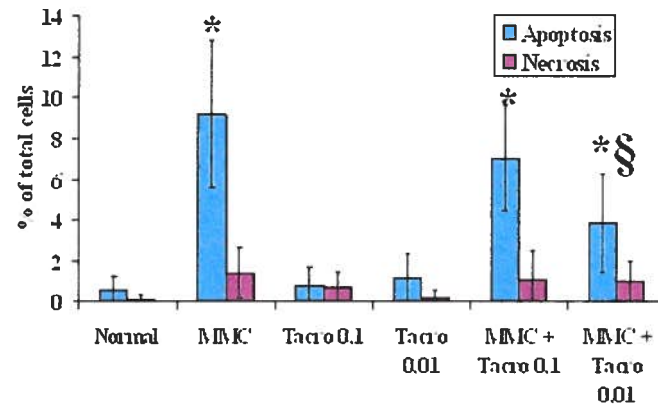
**A.** Viability of HUAEC exposed to CsA (1, 10 and 100 ug/ml) for up to 24 hours \*P < 0.05 vs normal control, n ≥ 6. **B.** BrdU incorporation in sub-confluent HUAEC exposed for 6, 16 and 24 hours to CsA (1, 10 and 100 ug/ml). \* p < 0.01 vs N, n ≥ 10. **C.** Percentage of apoptotic and necrotic cells in HUAEC exposed for 24 hours to CsA (1 and 10 ug/ml), MMC (0.01mg/ml) or both. \*P < 0.04 vs normal control (N), §P < 0.05 vs MMC, n ≥ 6. **D.** Ratio of ATP/ADP in HUAEC exposed for 0, 6, 16 and 24 hours to CsA (10 ug/ml), MMC (0.01mg/ml) or both. \*P < 0.01 vs normal control (N), n ≥ 6. **E.** Representative findings observed with HT/PI staining (upper panels) and DIOC<sub>6</sub>(3)/PI staining (lower panels) in adherent HUAEC exposed to normal medium (N), CsA (10 ug/ml), MMC (0.01mg/ml), CsA+MMC, and two positive controls for necrosis: heating to 65°C for 30 minutes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20mM) for 45 minutes. Necrotic cells are characterized by positive PI staining, cell swelling, absence of chromatin condensation and loss of mitochondrial function.



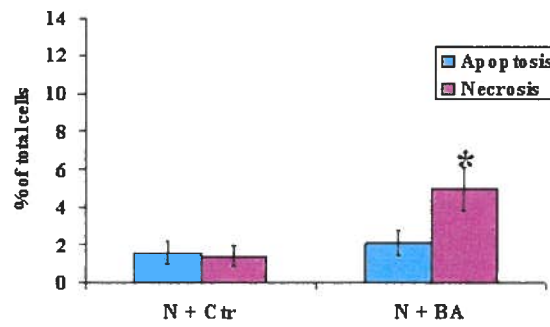
**Figure 2. Cyclosporin A does not activate p53 and caspases in HUAEC.**

**A.** Western blot showing absence of p53 induction in HUAEC exposed to CsA (10 ug/ml), for 24 hours. These results are representative of three independent experiments. **B.** Preincubation with DEVD-CHO did not inhibit development of necrosis in HUAEC exposed to CsA for 24 hours whereas it significantly attenuated apoptosis induced by MMC, \*P<0.003, n =9. **C.** Western blots showing absence of caspase-8 and caspase-1 activation in HUAEC exposed to CsA (10 ug/ml) or MMC (0.01 mg/ml) for 24 hours. These results are representative of two independent experiments.

A



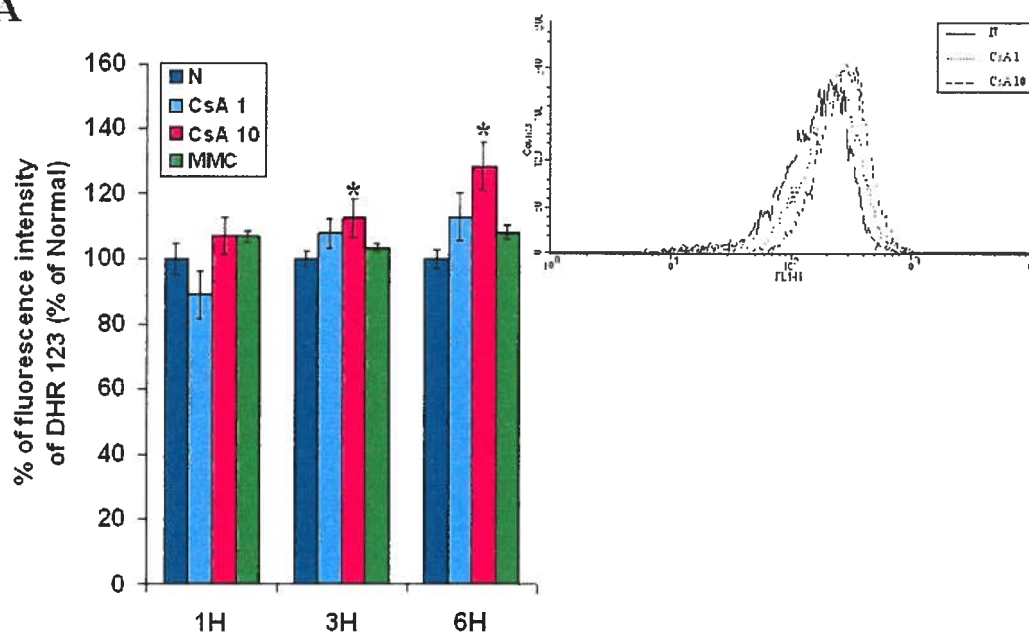
B



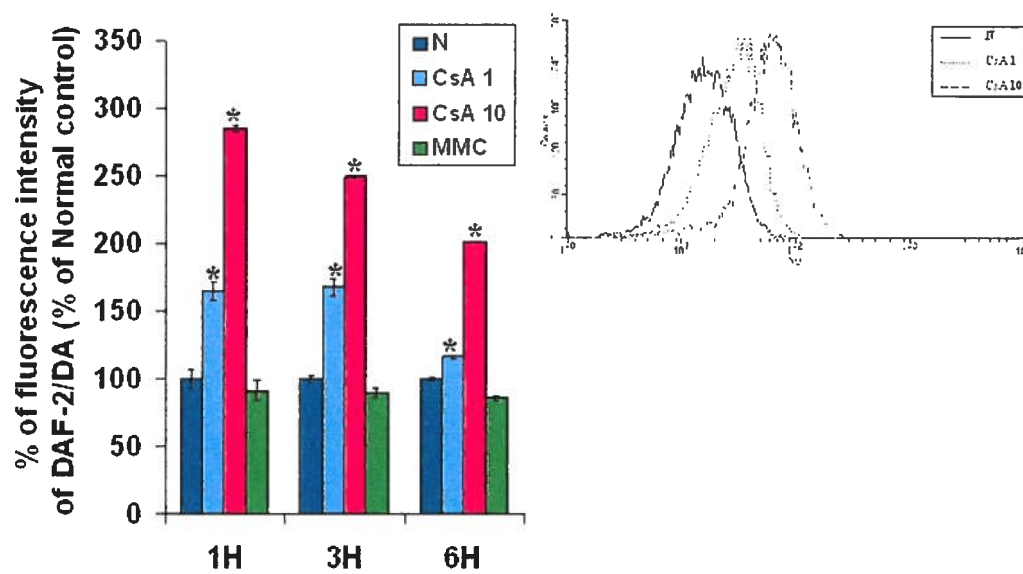
**Figure 3. Role of calcineurin inhibition and permeability transition inhibition on CsA-induced cell death.**

A. HUAEC were exposed to MMC, tacrolimus 0,1 and 0,01 ug/ml or both for 24 hours followed by evaluation of apoptosis and necrosis using HT and PI staining. There was significantly more apoptotic cells in presence of MMC as compared with normal control (\*P<0.002, n=8). Tacrolimus did not enhance development of apoptosis nor necrosis and significantly reduced development of apoptosis in presence of MMC (§P<0.005 vs MMC, n=8). B. HUAEC were exposed to bongkreikic acid (50 uM) or vehicle for 24 hours followed by evaluation of apoptosis and necrosis using HT and PI staining. Necrosis was significantly enhanced in presence of bongkreikic acid (\*P<0.002 vs control, n=9).

A



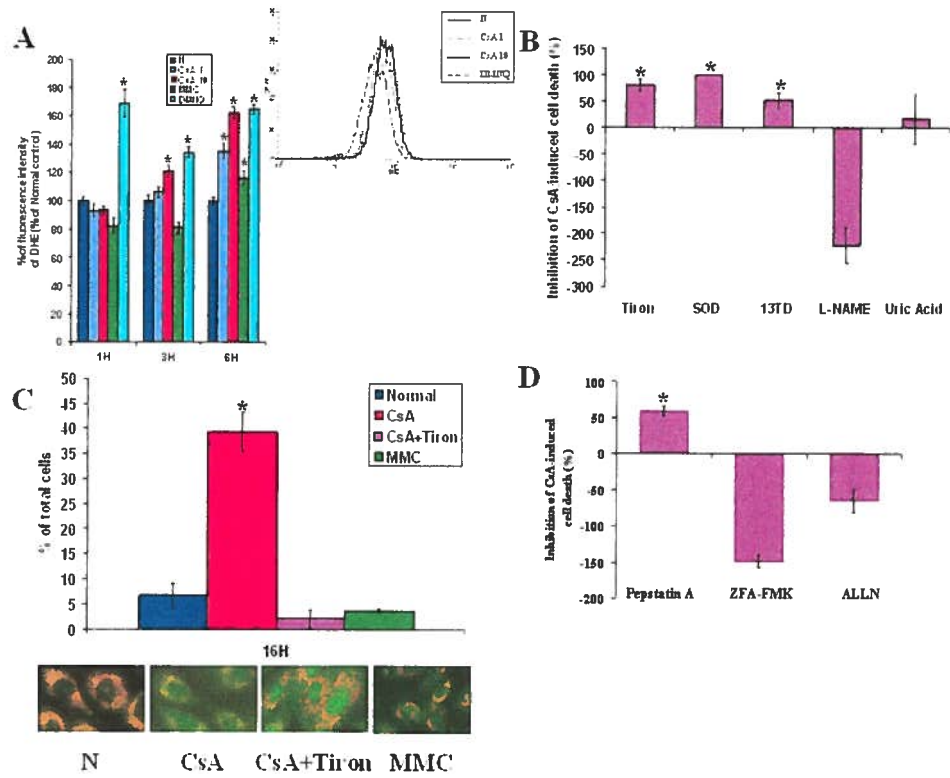
B



**Figure 4. Detection of cyclosporin A-induced peroxynitrite and NO formation in HUAEC.**

**A.** FACS analysis of HUAEC stained with DHR 123 showing increased generation of peroxynitrite after exposure to CsA (10 ug/ml) for 6 hours, but not with MMC (0.01mg/ml). (\*P<0.04 vs normal control (N), n = 6). Representative FACS overlays for data obtained at 6 hours are shown. **B.** FACS analysis of HUAEC stained with DAF-2/DA showing increased generation of nitric oxide after exposure to CsA (1 and 10 ug/ml) for 1, 3 and 6 hours, but not with MMC (0.01mg/ml). (\*P<0.005 vs normal control (N), n = 6). Representative FACS overlays for data obtained at 1 hour are shown.





**Figure 5. Cyclosporin A-induced superoxide formation and lysosomal damage in HUAEC.**

**A.** FACS analysis of HUAEC stained with DHE showing a dose-dependent increase in generation of superoxide after exposure to CsA (1 and 10 ug/ml) for 3 and 6 hours and at 6 hours with MMC (0.01mg/ml). (\*P<0.01 vs normal (N), n ≥ 6). 2,3-dimethoxy-1-naphthoquinone (DMNQ) is a positive control for induction of reactive oxygen radicals. Representative FACS overlays for data obtained at 6 hours are shown. **B.** Percentage inhibition of CsA-induced cell death (CsA 10 ug/ml for 24 hours) in presence of Tiron (0,1 uM), Superoxide dismutase (SOD) (500U/ml), 1,3-dimethyl-2-thiourea (1,3 DT) (0,1 mM) and uric acid (1mM).(\*P<0.01, n ≥16 per conditions). **C.** Lysosomal dysfunction, evaluated with acridine orange staining, in HUAEC exposed for 16 hours to normal medium (N), CsA 10 (ug/ml), CsA + Tiron (0,1 uM) or MMC (0.01mg/ml) (\*P=0.0001 vs N, n ≥5). Lower panel: representative findings in HUAEC treated for 16 hours and stained with acridine orange. Lysosomal dysfunction (showing green fluorescence instead of red) is found in HUAEC exposed to CsA but not in HUAEC exposed to CsA + Tiron or MMC (\*P=0.0001 vs N, n ≥5). **D.** Percentage inhibition of CsA-induced cell death (CsA 10 ug/ml for 24 hours) in presence of pepstatin A (100 uM), ZFA-FMK (100uM) and ALLN (100uM), \*P<0.0001, n ≥16 .

### **3.2 ARTICLE NO. 2**

#### **Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells**

PAR

Marc-André Raymond, Normand Vigneault, Valerie Luyckx et Marie-Josée Hébert

Publié dans

Biochemical and Biophysical Research Communications

Volume 291, Numéro 2, 261-269 (2002)

**Avant propos:**

L'apoptose endothéliale est impliquée par différentes études comme étant importante dans l'initiation de l'épaississement myo-intimal et du remodelage vasculaire. Suite aux travaux de l'article précédent, nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose endothéliale pourrait jouer un rôle dans le contrôle des dommages suite à une insulte vasculaire et contribue à la réparation du vaisseau. L'apoptose pourrait donc jouer un rôle de régulation sur l'environnement local vasculaire, selon un processus semblable à l'hypothèse proposée par David L. Vaux. L'hypothèse propose que l'apoptose des cellules, suite à une infection virale, serve de mécanisme de défense pour les cellules voisines. Nous commençons à mieux comprendre les mécanismes intracellulaires de régulation de l'apoptose, mais les effets de l'apoptose cellulaire sur l'environnement local ne sont pas caractérisés. Dans le deuxième article, nous avons découvert que la stimulation de l'apoptose des CE permet la relâche des facteurs solubles ayant une activité anti-apoptotique, pro-proliférative et pro-angiogénique sur les CE. L'activité anti-apoptotique autocrine est p53-indépendante, elle est associée à une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une diminution de Bax, ainsi qu'une inhibition de la relâche du cytochrome C de la mitochondrie. L'activité anti-apoptotique semble impliquée la voie de la PKC dans les CE menant à la résistance à l'apoptose. Les facteurs solubles relâchés par les cellules endothéliales en condition pro-apoptotiques joueraient un rôle protecteur au niveau de l'endothélium par une activité anti-apoptotique. Ces facteurs solubles permettraient de bloquer l'apoptose des cellules endothéliales environnantes. L'inhibition de l'apoptose préviendrait une atteinte généralisée de l'endothélium. Dans un deuxième temps, les facteurs solubles

permettraient de stimuler la réparation des vaisseaux. L'induction de la prolifération et de l'angiogénèse chez les CE par les facteurs solubles favoriseraient la réendothélisation suite à une insulte.

- Marc-André Raymond a contribué à l'élaboration intellectuelle du projet et à la planification expérimentale en laboratoire et a effectué la majorité des expériences présentées dans l'article. En collaboration avec le Dr Marie-Josée Hébert, il a aussi participé à l'écriture du manuscrit.
- Normand Vigneault a contribué aux expériences d'immunobavardage.
- Valerie Luyckx a effectué les premières expériences préliminaires de coloration en cristal violet et en fluorescence au hoechst et à l'iodure de propidium.

## **Abstract**

The mechanisms of cytoprotection conferred by stress preconditioning remain largely uncharacterized in endothelial cells (EC). We report that stress preconditioning of EC with serum starvation induces the release of soluble mediator(s) that confer resistance to apoptosis, increase proliferation and enhance angiogenesis in a second set of «non-preconditioned» EC. Preconditioning was found to target specifically the mitochondrial control of apoptosis in EC with increased protein levels of Bcl-2, decreased protein levels of Bax and decreased cytosolic release of cytochrome C. Regulators of apoptosis acting upstream and downstream of the mitochondria such as p53, cIAP-1, cIAP-2 and XIAP were not altered. Mediators classically associated with preconditioning in other cell types, such as adenosine, opioids and nitric oxide are not implicated in this cytoprotective loop. Blockade of protein kinase C-dependent signaling inhibited cytoprotection of EC. Further characterization of this paracrine pathway should provide insights into the molecular regulation of preconditioning in endothelial cells.

**Key words:** preconditioning, apoptosis, proliferation, angiogenesis, endothelial cell, Bcl-2, Bax, cytochrome C, p53, IAP, ERK, protein kinase C

## Introduction

Stress preconditioning is one of the most effective experimental tool for protecting the vasculature against a wide array of insults [1, 2]. In preconditioning, acquisition of resistance to cell death follows previous exposure to stress such as heat, ischemia, oxidative stress or serum deprivation [2, 3]. Stress preconditioning reduces infarct size in organ models of ischemia and ischemia-reperfusion injury [1, 4] and has also proven useful in protecting various organs during preservation before transplantation [5-7]. Preservation of endothelial integrity is a major component of the cytoprotective activity associated with preconditioning in vivo [1, 8]. However, the precise signaling pathways activated by stress conditioning, the genetic programs that direct stress conditioning and the exact cytoprotective mechanisms deployed within EC to prevent cell death remain largely uncharacterized.

Activation of EC apoptosis in response to stress is an important determinant of endothelial dysfunction associated with vascular injury [9]. Regulation of apoptosis occurs through a complex interplay of inhibitory molecules and activator molecules that govern the state of resistance to apoptosis within a given cell [10]. Pivotal control of apoptosis occurs at the mitochondrial level where different signals converge to trigger or inhibit the release of cytochrome C and other activators of apoptosis, leading to activation of caspases and execution of the apoptotic program [10, 11]. The Bcl-2 gene family is the most important group of gene products involved in the

control of cytochrome C release from the mitochondria [11, 12]. Various anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family regulate the mitochondrial release of cytochrome C, and sensitivity to apoptotic stimuli clearly depends on the balance between expression of anti and pro-apoptotic gene products [10]. Hence, it is likely that acquisition of resistance to injury following preconditioning is associated with alterations in the balance of pro- and anti-apoptotic molecules. However, the repercussions of preconditioning on the molecular regulation of apoptosis in EC, and the mediators that govern the state of resistance to cell death in preconditioned EC have yet to be characterized.

In the present study, we show that stress conditioning of EC with serum starvation induces the release of soluble mediator(s) that confer resistance to apoptosis, increase proliferation and enhance angiogenesis in a second set of EC. We explore the molecular events regulating inhibition of apoptosis and study the soluble mediators and signaling pathways implicated in this paracrine cytoprotective activity in EC.



## **Materials and Methods**

### ***Culture of endothelial cells***

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated and cultured as described in our previous work [13] or obtained from Clonetics and used at passages 2 and 4.

### ***Viability assays using crystal violet staining***

Cells were grown to near confluence in 1% gelatin-coated 96-well plates and exposed to the various experimental conditions. At the end of the incubation period, 10  $\mu$ l of 0.75 % crystal violet/30% acetic acid was added to each well and incubated at room temperature for 15 min. The plates were gently washed with water and were allowed to dry overnight. The absorbency of each well, which is proportional to the amount of viable cells per well, was read at 550 nm with a LP400 Microplate Reader (Diagnostics Pasteur). Viability is expressed as a percentage of normal control (100 X (cell number in treated cells/cell number in normal control)). This technique has been used extensively for quantitative estimation of cell survival and death [14, 15].

### ***Evaluation of angiogenesis with branching formation assay***

Angiogenesis was studied in vitro using a branching formation assay on Matrigel as described before [16] by an investigator blinded to the experimental condition. Branching formation was assessed at 200 X and a branch was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes) [16].

#### ***Screening for apoptosis using fluorescence microscopy***

Apoptosis was assessed using fluorescence microscopy of HUVEC, grown in 1 %-gelatin coated 24-well plate and stained with Hoechst 33342 (1 µg/ml for 10 min at 37°C) and propidium iodide (PI, 5 µg/ml), as we described previously [13]. Apoptosis was evaluated in adherent cells at a magnification of 400X by an investigator blinded to the experimental condition. At least 3 fields were evaluated per well and all experiments were performed in quadruplicates.

#### ***Assessment of proliferation using BrdU incorporation assay***

Measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis was performed using Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer. BrdU incorporation was measured in sub-confluent (50 % confluence) HUVEC. Incorporation is expressed as: 100 X (incorporation in cells exposed to serum-free conditioned medium/incorporation in cells exposed to serum-free control).

### ***Immunoblotting analysis***

Proteins were extracted as we described previously [13]. Samples containing 50-100 µg of proteins were separated on a 12% polyacrylamide gel and transferred to a nylon-supported nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). The membrane was blocked with Tris Buffered Saline (TBS) + 5 % non-fat milk for 60 minutes, followed by overnight incubation at 4°C in TBS-1 % non-fat milk with anti-p53 (DO-1) monoclonal antibody 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Bax monoclonal antibody 1:125 (PharMingen Canada Inc.), anti-human Bcl-2 monoclonal antibody 1:250 (PharMingen Canada Inc.), anti-non-phosphorylated and anti-phosphorylated ERK1/2 (New England Biolabs), anti-cIAP1 polyclonal antibody 1:1000 (R&D Systems, MN, USA), anti-cIAP2 polyclonal antibody 1:1000 (R&D Systems, MN, USA) or anti-XIAP polyclonal antibody 1:1000 (R&D Systems, MN, USA). The membrane was then washed three times and incubated 1 hour with TBST (TBS-0.5 % Tween 20), incubated with a horseradish peroxidase-labeled secondary antibody 1:2000 for an hour (Biosource Int., CA, USA) and washed again in TBST. Signal was visualized with enhanced chemiluminescence (Life technologies Inc., Canada) by exposing the membrane to film (Kodak film X-OMAT AR from Amersham Pharmacia Biotech, Canada). All membranes were stripped (2 % SDS, 100 mM β-mercaptoethanol and 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) at 50°C for 30 min. with gentle shaking and reprobed with anti-actin monoclonal antibody 1:250 (Cedarlane, Ont., Canada) as a control for protein loading.

### ***Cytochrome C release***

For subcellular fractionation, cells were resuspended in 500 µl of cold buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 20 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.2 U/ml aprotinin, 0.025 % sodium azide and 0.1 % PMSF) and homogenized with 10 strokes. Nuclei (1000 g, 15 min.) and mitochondria (10,000 g, 15 min.) were pelleted by sequential differential centrifugation. The supernatants were clarified further by centrifugation at 100,000 g for 60 min.(S-100 fraction) [17]. The subsequent immunoblotting procedure was the same as that used for standard immunoblotting. An anti-Cytochrome C monoclonal antibody 1:1000 (PharMingen Canada Inc.) was used for overnight incubation.

### ***Characterization of the paracrine factors***

Media were pre-incubated for 2 hours with blocking antibodies: anti-bFGF, 4 µg/ml (R&D Systems, MN, USA), anti-IGF-1 antibody, 80 µg/ml (R&D Systems, MN, USA), anti-VEGF antibody, 0.1 µg/ml (R&D Systems, MN, USA), anti-angiopoetin-1, 4 µg/ml (RDI, NJ, USA), anti-angiopoetin-2, 4 µg/ml (RDI, NJ, USA), anti-IL-1β antibody 0.1 µg/ml (R&D Systems, MN, USA), anti-PDGF-BB, 0.1 µg/ml (R&D Systems, MN, USA) or with their appropriate isotype-matched controls and then added to subconfluent HUVEC for 24 hours followed by measurement of viability with a crystal violet viability assay. All antibody

concentrations were chosen to yield at least a 50 % inhibition of biological activity of the ligand, according to dose-response curves provided by the manufacturers.

### ***Reagents***

SB203580, Wortmannin, LY294002, staurosporine and PD98059 were bought from Calbiochem (USA). Aminophylline was from Abbott Laboratories (Canada). Other reagents were bought from Sigma Chemicals (USA) unless stated otherwise.

### ***Statistical analysis***

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using Student's T-test or ANOVA, as appropriate. A P value of  $< 0.05$  was taken to represent a statistically significant difference between group means.

## Results

### **Endothelial preconditioning activates paracrine pathways with potent activity on apoptosis and angiogenesis of endothelial cells**

A first set of HUVEC was grown to confluence and then exposed to serum-free medium (solely RPMI 1640 + glutamine) for periods ranging from 4 to 24 hours. The serum-free conditioned media (SSC) were collected, centrifuged (500 g, 10 min) to remove floating cells and used to serum starve a second set of HUVEC for 24 hours. The viability of HUVEC exposed to this conditioned medium was compared to that of HUVEC exposed to normal medium (N) and to fresh serum-free medium (SS). SSC was associated with a significant enhancement in EC viability compared with SS (Fig. 1A). Enhancement of viability was present with SSC conditioned for 4 to 24 hours and maximal with SSC conditioned for 4 hours.

To determine whether release of paracrine growth factors occurs specifically in stressed cells or also during normal endothelial cell growth, we compared the growth promoting activity of medium conditioned by either normal or stressed serum-deprived HUVEC. Medium conditioned by normal HUVEC did not enhance growth as compared with fresh normal medium (Fig. 1B). However, when SSC was supplemented with 15 % FBS so that its composition would be similar to that of

normal medium, a significant growth promoting activity was found as compared with fresh normal medium (Fig. 1B). These results suggest that release of growth factors occurs in stressed EC but not during normal growth. We also determined whether the protective activity of SSC was associated with broad inhibition of apoptosis. We showed previously that mitomycin C (MMC), a DNA damaging agent, induces apoptosis of HUVEC [13]. Endothelial viability was significantly increased in HUVEC exposed concomitantly to SSC and MMC as compared with HUVEC exposed to normal medium containing similar concentrations of FBS and MMC (Fig. 1B). These results suggest that soluble mediator(s) released during stress conditioning induce(s) a broad resistance to apoptotic stimuli.

Paracrine factors present in SSC may enhance viability of EC by stimulating proliferation of surviving cells and/or inhibiting apoptosis. To delineate the mechanism(s) operative in our system, we evaluated the percentage of HUVEC showing classical morphological signs of apoptosis when treated with either SS or SSC for 24 hours. Evaluation of apoptosis by fluorescence microscopy using Hoechst 33342 and propidium iodide revealed a significant inhibition of apoptosis in HUVEC in presence of SSC (Fig. 2A). We also compared the proliferation rates of HUVEC treated with SS or SSC using a BrdU incorporation assay. In subconfluent cells, SSC induced a significant proliferative response as compared with SS (Fig. 2B). These results suggest that inhibition of apoptosis and stimulation of proliferation mediate the cytoprotective activity of conditioned medium.

As protection of the endothelium also depends on promoting repair and angiogenesis, we evaluated the paracrine repercussions of preconditioning on angiogenic activity using branching formation on matrigel matrix as described before [16]. Formation of characteristic capillary-like network was significantly increased in HUVEC grown on matrigel for 24 hours in presence of SSC as compared with SS (Fig. 2C). Hence, preconditioning leads to paracrine induction of resistance to apoptosis, proliferation and angiogenesis.

### **Conditioned medium targets the mitochondrial control of apoptosis in EC**

Using western analysis, we evaluated the molecular regulation of apoptosis in HUVEC exposed to SSC. Serum starvation characteristically activates p53-dependent apoptosis [18, 19]. As expected, HUVEC exposed to fresh serum-free medium for 24 hours showed a significant increase in p53 protein levels (Fig. 3A). In HUVEC exposed to SSC, a significant induction of p53 was also found (Fig. 3A), suggesting that inhibition of apoptosis conferred by conditioned medium occurs downstream of p53.

One of the major pathways of apoptosis regulation downstream of p53 resides at the mitochondrial level [10]. As the release of cytochrome C from the



mitochondria to the cytosol is an important indicator of the apoptotic commitment of cells [11, 20, 21], we investigated the effect of SSC on cytochrome C release. SSC was associated with decreased cytosolic release of cytochrome C as compared with SS (Fig. 3B). The Bcl-2 gene family is the most important group of gene products involved in the control of cytosolic release of cytochrome C [11, 12]. We found increased protein levels of Bcl-2 in HUVEC exposed to SSC as compared with both SS and normal medium (Fig. 3C). Also, decreased protein levels of Bax, a prototypic pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, were found in HUVEC exposed to SSC as compared to SS (Fig. 3C).

Inhibition of apoptosis by growth factors may also be regulated downstream of the mitochondrial level through modulation of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) [22-24]. However, in our system, exposure to SSC for 24 hours was not associated with an increase in cIAP-1, cIAP-2 or XIAP protein levels as compared with serum-starved HUVEC (Fig. 3D). Thus, these results suggest that inhibition of endothelial apoptosis induced by conditioned medium is regulated specifically at the mitochondrial level.

### **Signaling pathways activated by conditioned medium**

To evaluate signaling pathways implicated in transduction of cytoprotective signals in EC, confluent HUVEC were incubated for 24 hours with either N, SS or SSC media in presence of wortmannin (10 nM) or LY294002 (2  $\mu$ M), two structurally dissimilar inhibitors of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 Kinase), PD98059 (25  $\mu$ M), an inhibitor of ERK 1/2, or their vehicle as control. The cytoprotective activity of SSC was not significantly decreased by any of these inhibitors (Fig. 4A). Also, ERK 1/2 was not phosphorylated in HUVEC following 30 minutes and 4 hours of incubation in SSC as compared with SS (Fig. 4B). Blockade of p38-dependent signaling with SB203580 (30  $\mu$ M), did not attenuate the cytoprotective activity of SSC (Fig. 4A). Incubation of SSC with staurosporine ( $10^{-8}$  M), an inhibitor of protein kinase C (PKC), abrogated the cytoprotective activity of SSC. The concentration of staurosporine used in this assay was within the  $IC_{50}$  for inhibition of PKC but was lower than concentrations used to induce apoptosis in HUVEC [25]. Hence, these results suggest that paracrine cytoprotection conferred by endothelial preconditioning is dependent on PKC and independent of p38 and ERK 1/2 MAPK and of PI-3 Kinase.

**The cytoprotective mediator(s) present in SSC differ from already described paracrine pathways associated with preconditioning**

To study the role of adenosine and opioid receptors in the cytoprotective activity of conditioned medium, aminophylline (100  $\mu$ g/ml), naloxone (10  $\mu$ M) or

vehicle (PBS) were added to N, SS and SSC media and exposed to HUVEC for 24 hours. Blockade of adenosine receptors with aminophylline or blockade of opioid receptors with naloxone failed to attenuate the cytoprotective effect of conditioned medium on HUVEC (Table 1) whereas similar concentrations of these inhibitors effectively blocks cytoprotection conferred by preconditioning in other cell types [26, 27].

To study the role of nitric oxide in this system, we inhibited nitric oxide synthase with L-NAME during conditioning. L-NAME (1 mM) or vehicle (PBS) was dissolved in serum free medium and incubated with confluent HUVEC for 4 hours. These conditioned media were then collected and exposed to a second set of HUVEC for 24 hours. Inhibition of NO synthesis during preconditioning did not attenuate the cytoprotective activity of conditioned medium on a second set of HUVEC (Table 1). L-NAME (1 mM) was also added to N, SS and SSC media and exposed to confluent HUVEC for 24 hours to test the possibility that conditioned medium could protect EC through induction of NO synthase. Blocking NO synthase during exposure to conditioned medium did not inhibit cytoprotection (Table 1). These results suggest that NO is not a mediator of the cytoprotective paracrine activity that develops in EC in association with preconditioning.

To study the role of endothelin in our system, HUVEC were pre-incubated for 30 minutes with bosentan (1  $\mu$ M), an inhibitor of endothelin A and B receptors, followed by addition of bosentan (1  $\mu$ M) into N, SS and SSC media for 24 hours. Addition of bosentan, did not inhibit the cytoprotective activity of SSC on HUVEC (Table 1).

Finally, we used neutralizing antibodies against VEGF, IL-1 $\beta$ , PDGF BB, IGF-1, bFGF, angiopoetin-1 and angiopoetin-2 to evaluate the importance, in our system, of growth factors known for their importance in controlling angiogenesis and apoptosis of vascular cells. Incubation with these neutralizing antibodies (using concentrations above IC<sub>50</sub> for each antibody) did not attenuate the cytoprotective activity of SSC on HUVEC as compared with SSC incubated with isotype-matched controls (Table 2).

To characterize the biochemical nature of mediator(s) released by EC during preconditioning, SSC was exposed to trypsin/EDTA (0.5  $\mu$ g/ml/0.2  $\mu$ g/ml) for 3 hours at 37°C followed by inactivation of trypsin activity with soybean trypsin inhibitor (800  $\mu$ g/ml). A control included SSC treated with PBS for 3 hours at 37°C followed by addition of soybean trypsin inhibitor. The cytoprotective activity of SSC was found to be sensitive to inactivation with trypsin (viability (expressed as % of normal control): SSC = 63,6 $\pm$ 3,8%; SSC+TRYP = 57,9 $\pm$ 6,3%;  $p < 0.05$  when compared with SSC,  $n \geq 14$ ). SSC was also boiled for 15 minutes. Boiling did not attenuate the cytoprotective activity of conditioned medium on HUVEC (viability (expressed as % of normal control): SSC = 55,5 $\pm$ 4,7%; SSC Boiled = 55,6 $\pm$ 5,6%;  $p > 0.05$  when compared with SSC,  $n \geq 8$ ).

Finally, SSC was fractionated using 1 and 10 kD cut-off membranes and the various conditions or fractions were incubated on HUVEC for 24 hours followed by assessment of viability with crystal violet viability assay. The cytoprotective activity

of SSC was present in fractions of 1 to 10 kD (viability (expressed as % of normal control): SS =  $44,3 \pm 7,2\%$ ; SSC =  $54,2 \pm 7,1\%$ ; >10 kD =  $41,3 \pm 4,3\%$ ; between 10 kD and 1 kD =  $58,3 \pm 4,1\%$ ;  $p < 0.02$  when compared with SS,  $n \geq 12$ ). These results suggest that the paracrine anti-apoptotic mediator(s) is/are most likely a low molecular weight heat-stable peptide(s).

## Discussion

Stress preconditioning is one of the most effective experimental adaptation for protecting the vasculature against a wide array of insults [1, 3]. In many clinical settings however, use of preconditioning for induction of resistance to stress is either unpractical or impossible, as injuries to various organs are rarely planned events. Hence, we characterized the paracrine repercussions of endothelial preconditioning in the aim of defining means of transferring the cytoprotective activity of preconditioning to « non-preconditioned » EC. Preconditioning was performed with various lengths of serum starvation. Serum deprivation has been characterized as an effective preconditioning procedure [28] and is not classically associated with release of inflammatory mediators that could obscure or counteract the paracrine repercussions of preconditioning. Also, we and others showed that serum starvation induces the characteristic features of apoptosis in HUVEC [13, 25]. Hence, using serum starvation both for preconditioning and induction of a second stress allowed us to study the paracrine repercussions of preconditioning on regulation of endothelial apoptosis.

Our results show that preconditioning of EC is associated with release of soluble mediators that confer broad resistance to apoptosis in a second set of «non-preconditioned» EC. Release of soluble cytoprotective mediator(s) occurred during preconditioning but not during normal endothelial growth. Preconditioned medium significantly increased proliferation and angiogenic activity of normally quiescent EC. These results suggest that stress preconditioning of EC activates paracrine

pathways of potential importance for protecting the endothelium against apoptosis and favoring repair.

The paracrine repercussions of stress preconditioning on molecular regulation of apoptosis of EC and the exact cytoprotective mechanisms deployed within EC in association with preconditioning have remained largely uncharacterized. Our results show that inhibition of apoptosis by conditioned medium is associated with increased protein levels of Bcl-2, decreased levels of Bax and decreased cytosolic release of cytochrome C. However, induction of p53 in EC exposed to conditioned was not decreased as compared with serum starved controls. p53 is a classical initiator of apoptosis secondary to serum starvation, acting upstream of the mitochondria [10, 18]. Protein levels of IAPs, post-mitochondrial inhibitors of apoptosis [10], were not increased in EC exposed to conditioned medium. These results suggest that blockade of apoptosis conferred by preconditioning occurs specifically at the mitochondrial level through modulation of the balance between anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family.

Activation of p38 MAPK has been implicated in transduction of cytoprotective signals in cardiomyocytes exposed to preconditioning [29, 30]. However, in our system, blockade of p38-dependent signaling with SB203580 did not attenuate the cytoprotective activity of conditioned medium. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) and PI-3 kinase have been implicated in transduction of cytoprotective signals induced by preconditioning in various cell types [3, 29]. Our results, using specific inhibitors of ERK 1/2 and PI-3 kinase, show that the paracrine cytoprotective activity that develops in EC exposed to conditioned

medium is not mediated by these pathways. Also, phosphorylation of ERK 1/2 was not increased by conditioned medium. Various reports have suggested a key role for activation of protein kinase C (PKC) in transduction of cytoprotective signals in animal models and isolated cell models of preconditioning [31, 32]. Yet, the importance of activation of PKC in endothelial preconditioning remained to be studied. In our system, staurosporine (in concentrations sufficient to block PKC but lower than that needed to induce apoptosis), abolished the cytoprotective activity of conditioned medium. These results suggest that endothelial cytoprotection conferred by preconditioning is mediated by PKC-dependent pathways whereas p38, ERK 1/2 and PI-3 kinase-dependent pathways are not implicated in this system.

Nitric oxide (NO) [2, 28, 33], adenosine [1, 34] and opioids [1] have been implicated in the cytoprotective activity of stress preconditioning and in preservation of mitochondrial function [4] in various cell systems other than endothelial cells. Also, activation of adenosine receptors and opioid receptors has been widely implicated in PKC activation induced by preconditioning in cardiomyocytes [1]. However, in our system, blockade of adenosine or opioid receptors with aminophylline and naloxone did not attenuate the cytoprotective activity of conditioned medium on EC, thus excluding a role for these mediators in this paracrine cytoprotective activity. Inhibition of nitric oxide synthase with L-NAME during preconditioning or in presence of conditioned medium did not attenuate the cytoprotective activity of conditioned medium, suggesting that NO is not a component of this paracrine cytoprotective activity. Also, chemical function blockade of endothelin A and B receptors failed to attenuate the cytoprotective activity of



preconditioned medium, thus ruling out a contribution of endothelin to this paracrine cytoprotective activity.

Our results also suggest that classical regulators of endothelial apoptosis and angiogenesis such as bFGF [35, 36], VEGF [22-24], angiopoietin-1 [37] and angiopoietin-2 [38], IGF-1, and PDGF BB [39] are not components of this cytoprotective paracrine activity as co-incubation with function blocking antibodies failed to attenuate the pro-survival activity of conditioned medium. Partial biochemical characterization suggests that this cytoprotective activity is mediated by novel heat-stable low molecular weight peptide(s).

In summary, stress preconditioning of endothelial cells activates paracrine cytoprotective pathways that confer resistance to apoptosis, increase proliferation and enhance angiogenesis in a second set of «non-preconditioned» EC. Paracrine cytoprotection conferred by preconditioning targets the mitochondrial control of apoptosis in EC with increased protein levels of Bcl-2, decreased protein levels of Bax and decreased cytosolic release of cytochrome C. Classical soluble mediators released during preconditioning in other cell types, such as adenosine, nitric oxide and activation of opioid receptors, are not implicated in this endothelial cytoprotective loop. Further characterization of this paracrine pathway should provide insights into the molecular regulation of preconditioning in endothelial cells.

**Acknowledgements**

This work was supported by operating grants to MJH from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant # mt-15447) and the Kidney Foundation of Canada. MJH is a scholar of the CIHR. We thank the Fondation Jeanne Lévesques and the Fondation CHUM for their support.

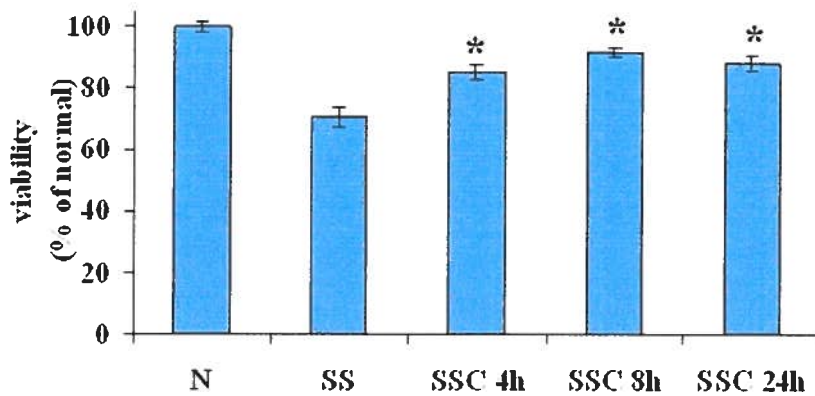
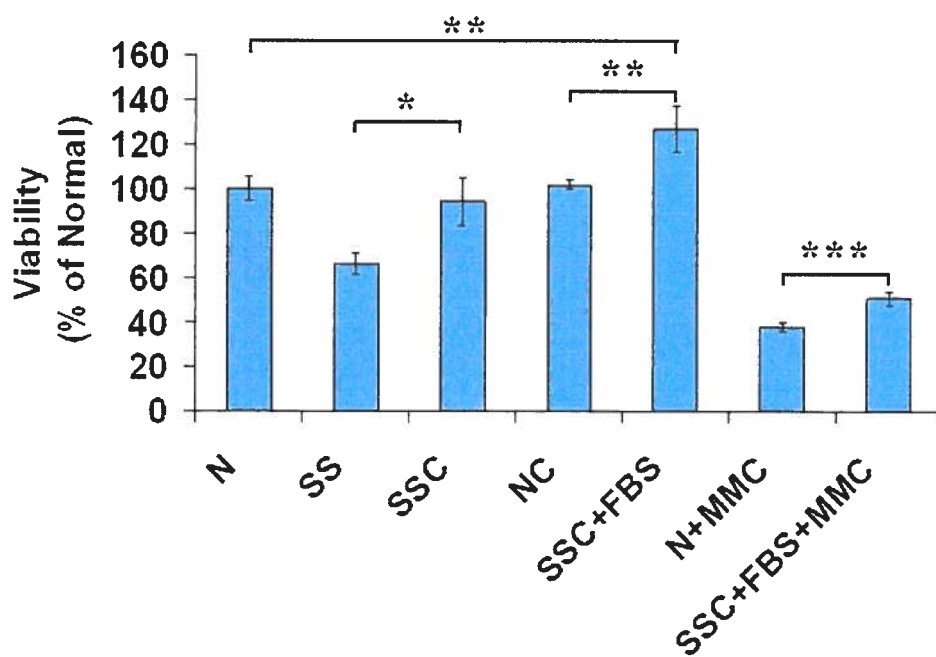
## References

- 1 Rubino, A. and Yellon, D. M. (2000). *Trends Pharmacol Sci* 21, 225-30.
- 2 Bolli, R. (2000). *Circ Res* 87, 972-83.
- 3 Pohlman, T. H. and Harlan, J. M. (2000). *J Surg Res* 89, 85-119.
- 4 Carden, D. L. and Granger, D. N. (2000). *J Pathol* 190, 255-66.
- 5 Totsuka, E., Fung, J. J., Urakami, A., Moras, N., Ishii, T., Takahashi, K., Narumi, S., Hakamada, K. and Sasaki, M. (2000). *Hepatology* 31, 577-80.
- 6 Kevelaitis, E., Oubenaissa, A., Peynet, J., Mouas, C. and Menasche, P. (1999). *Circulation* 100, II345-50.
- 7 Yadav, S. S., Sindram, D., Perry, D. K. and Clavien, P. A. (1999). *Hepatology* 30, 1223-31.
- 8 Arai, M., Thurman, R. and Lemasters, J. (2000). *Hepatology* 32, 297-302.
- 9 Isner, J., Kearney, M., Bortman, S. and Passeri, J. (1995). *Circulation* 91, 2703-2711.
- 10 Hengartner, M. O. (2000). *Nature* 407, 770-6.
- 11 Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). *Science* 281, 1309-12.
- 12 Adams, J. M. and Cory, S. (1998). *Science* 281, 1322-6.

- 13 Hébert, M., Gullans, S., Mackenzie, H. and Brady, H. (1998). *Am J Pathol* 152, 523-532.
- 14 Santos, B. C., Chevaile, A., Hebert, M. J., Zagajeski, J. and Gullans, S. R. (1998). *Am J Physiol* 274, F1167-F1173.
- 15 Smith, C. N., Lindsay, C. D. and Upshall, D. G. (1997). *Hum Exp Toxicol* 16, 247-253.
- 16 Pollman, M. J., Naumovski, L. and Gibbons, G. H. (1999). *J Cell Physiol* 178, 359-70.
- 17 Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J. and Bertrand, R. (2000). *Biochem Biophys Res Commun* 270, 868-79.
- 18 Prives, C. and Hall, P. (1999). *J Pathol* 1999 187, 112-126.
- 19 Ko, L. J. and Prives, C. (1996). *Genes Dev* 10, 1054-72.
- 20 Gottlieb, R. A. (2000). *FEBS Lett* 482, 6-12.
- 21 Kroemer, G. and Reed, J. C. (2000). *Nat Med* 6, 513-9.
- 22 Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G. and Kerbel, R. S. (1999). *Biochem Biophys Res Commun* 264, 781-8.
- 23 Nor, J., Christensen, J., Mooney, D. and Polverini, P. (1999). *Am J Pathol* 154, 375-84.
- 24 Gerber, H., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998). *J Biol Chem.* 273, 13313-6.

- 25 Zheng, L., Dengler, T. J., Kluger, M. S., Madge, L. A., Schechner, J. S., Maher, S. E., Pober, J. S. and Bothwell, A. L. M. (2000). *J Immunol* 164, 4665-4671.
- 26 Schaefer, S., Correa, S. D., Valente, R. J. and Laslett, L. J. (2001). *Am Heart J* 142, E4.
- 27 Liang, B. T. and Gross, G. J. (1999). *Circ Res* 84, 1396-400.
- 28 Andoh, T., Lee, S. Y. and Chiueh, C. C. (2000). *FASEB J* 14, 2144-6.
- 29 Ping, P. and Murphy, E. (2000). *Circ Res* 86, 921-2.
- 30 Baines, C. P., Wang, L., Cohen, M. V. and Downey, J. M. (1998). *J Mol Cell Cardiol* 30, 383-92.
- 31 Nakano, A., Cohen, M. V. and Downey, J. M. (2000). *Pharmacology and Ther* 86, 263-275.
- 32 Baines, C. P., Pass, J. M. and Ping, P. (2001). *Basic Res Cardiol* 96, 207-18.
- 33 Bolli, R., Manchikalapudi, S., Tang, X. L., Takano, H., Qiu, Y., Guo, Y., Zhang, Q. and Jadoon, A. K. (1997). *Circ Res* 81, 1094-107.
- 34 Hoshida, S., Kuzuya, T., Nishida, M., Yamashita, N., Oe, H., Hori, M., Kamada, T. and Tada, M. (1994). *Cardiovasc Res* 28, 1083-8.
- 35 Fuks, Z., Persaud, R., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J., Seddon, A., Cordon-Cardo, C. and Haimovitz-Friedman, A. (1994). *Cancer Res* 54, 2582-2590.

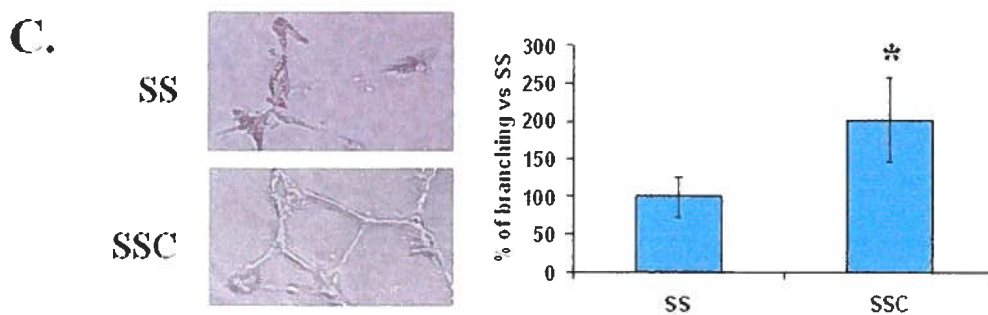
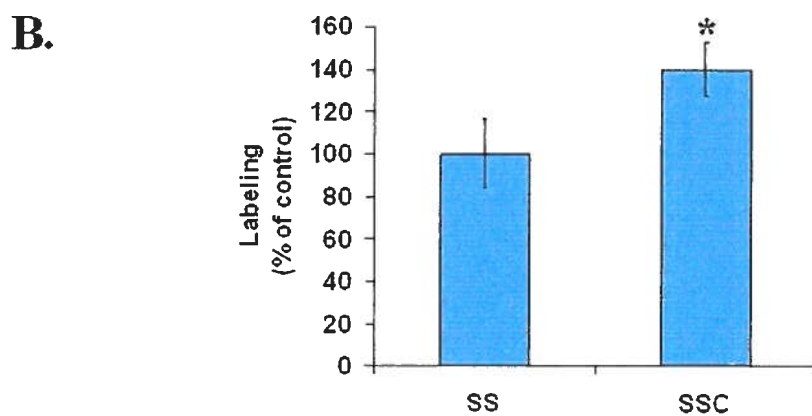
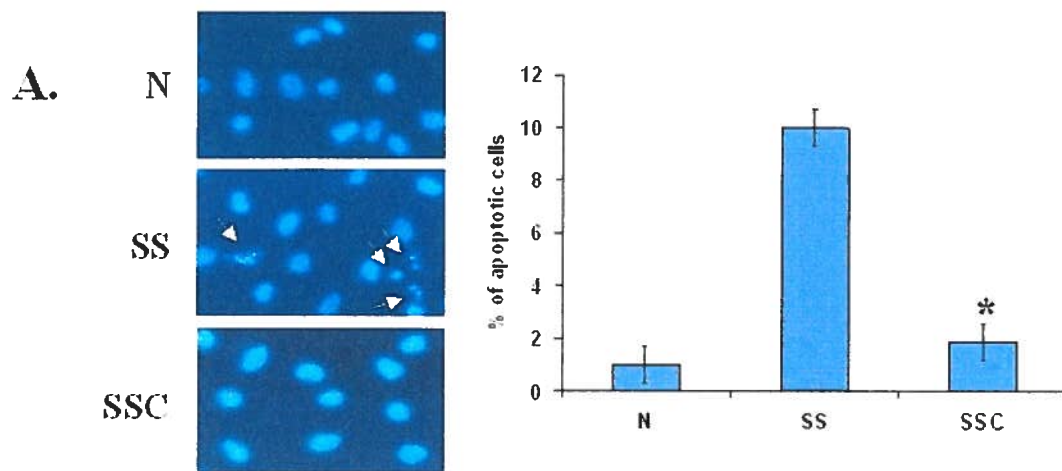
- 36 Mandriota, S. and Pepper, M. (1997). *J Cell Sci* 110, 2293-2302.
- 37 Kwak, H., Lee, S., Lee, Y., Ryu, C., Koh, K., Choi, H. and Koh, G. (2000). *Circulation* 101, 2317-2324.
- 38 Kim, I., Kim, J., Moon, S., Kwak, H., Kim, N. and Koh, G. (2000). *Oncogene* 19, 4549-4552.
- 39 Reinmuth, N., Liu, W., Jung, Y., Ahmad, S., Shaheen, R., Fan, F., Bucana, C., McMahon, G., Gallick, G. and Ellis, L. (2001). *FASEB J* 15, 1239-1241.

**A.****B.**

**Figure 1.**

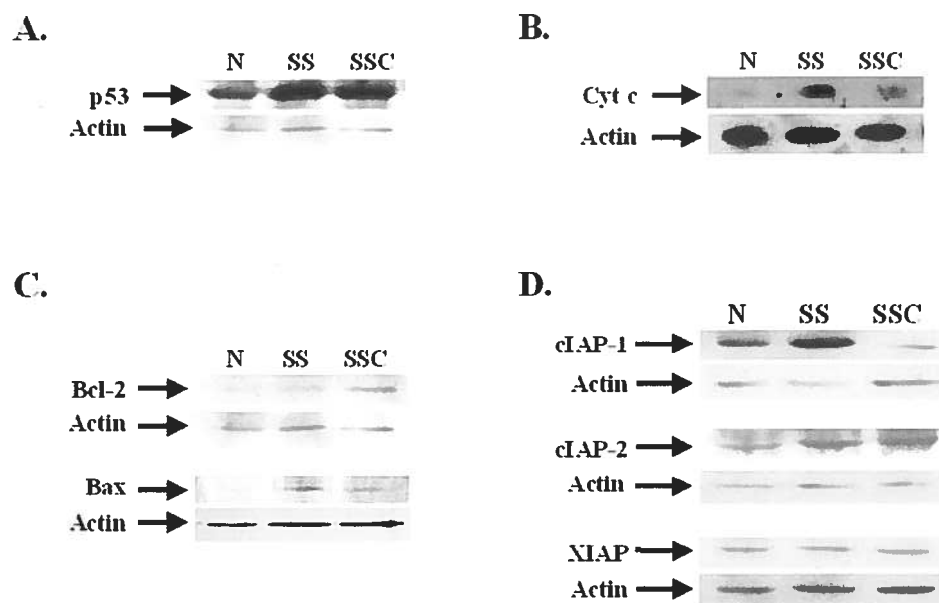
**A.** HUVEC exposed for 24 hours to fresh normal medium (N), fresh serum-free medium (SS) or serum-free medium preconditioned by serum-starved HUVEC (SSC) for 4 hours (SSC 4h), 8 hours (SSC 8h) or 24 hours (SSC 24h) respectively. Viability was estimated using crystal violet staining. Significantly more EC survived in presence of conditioned medium (SSC) as compared with fresh serum-free medium (SS). \*  $p < 0.001$  as compared with SS,  $n \geq 8$  in each group. **B.** HUVEC exposed for 24 hours to N, SS, SSC, normal medium conditioned by normal HUVEC for 4 hours (NC), SSC replenished with 20% FBS (so that its composition would be similar to normal medium) (SSC+FBS), fresh normal medium containing mitomycin C, 0.01 mg/ml (N+MMC), SSC replenished with 20% FBS and supplemented with MMC 0.01 mg/ml (SSC+FBS+MMC). Viability of HUVEC exposed to SSC+FBS was increased as compared with both N and NC. Viability of HUVEC exposed to mitomycin C was also increased in presence of SSC. \*  $p < 0.05$  as compared with SS, \*\*  $p < 0,05$  as compared with NC and N, \*\*\*  $p < 0.05$  as compared with N+MMC,  $n \geq 8$  in each group.





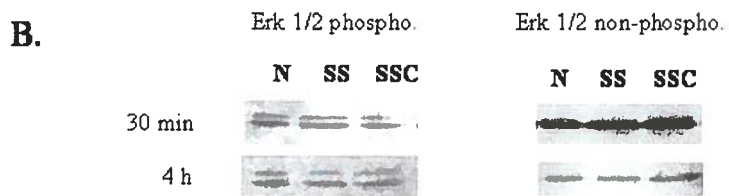
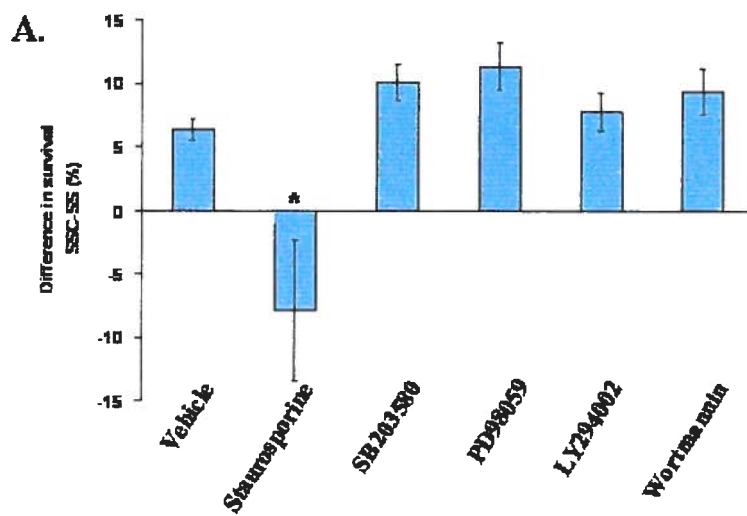
**Figure 2.**

**A.** Anti-apoptotic activity of conditioned medium. HUVEC exposed for 24 hours to N, SS, SSC, followed by staining with Hoechst 33342 and propidium iodide (Magnification 400 X). Arrows point to apoptotic cells. Graph shows the % of apoptotic cells, as estimated by Hoechst 33342 and propidium iodide staining in HUVEC exposed for 24 hours to N, SS, SSC. Significantly less apoptotic cells were found in presence of SSC as compared with SS. (SS vs SSC: \*  $p < 0,001$ ,  $n = 6$ .) **B.** BrdU incorporation in sub-confluent HUVEC exposed for 24 hours to SS or SSC. A significant increase in BrdU incorporation was found in HUVEC exposed to SSC as compared with SS. \*  $p < 0.0025$ ,  $n = 16$  in each group. **C.** Angiogenic activity of HUVEC exposed to conditioned medium. HUVEC were grown for 24 hours on growth factor deprived matrigel in presence of either SS or SSC supplemented with 10 % FBS. Significantly more branching occurred in presence of SSC as compared with SS. \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .



**Figure 3.**

**A.** Western blot analysis for p53 in HUVEC exposed to N, SS or SSC for 24 hours. Increased levels of p53 were found in HUVEC exposed to either SS or SSC as compared with N. **B.** Cytosolic release of Cytochrome C, evaluated by immunoblot of cytosolic protein extracts from HUVEC exposed to N, SS and SSC for 24 hours. Cytosolic release of Cytochrome C was inhibited in HUVEC exposed to SSC as compared with SS. **C.** Western blot analysis for Bcl-2 and Bax from total protein extracts of HUVEC exposed to N, SS and SSC for 24 hours. Increased Bcl-2 and decreased Bax protein levels were found in HUVEC exposed to SSC as compared with SS and N. **D.** Western blot analysis for cIAP-1, cIAP-2 and XIAP in HUVEC exposed to N, SS or SSC for 24 hours. Exposure to SSC did not increase cIAP-1, cIAP-2 and XIAP protein levels as compared with SS. All results are representative of at least three independent experiments.



**Figure 4.**

A. HUVEC were exposed to N medium, SS or SSC in presence of inhibitors (Staurosporine ( $10^{-8}$  M), SB203580 (30  $\mu$ M), PD98059 (25  $\mu$ M), LY294002 (2  $\mu$ M) and Wortmannin (10 nM)) or vehicle control for 24 hours. Viability was estimated with crystal violet staining. The data are represented as (viability of HUVEC exposed to SSC) - (viability of HUVEC exposed to SS). Staurosporine completely abolished the cytoprotective activity of SSC. \*  $p < 0.05$  as compared with vehicle,  $n \geq 8$  in each group. B. HUVEC were exposed to N, SS and SSC for 30 minutes and 4 hours. Phosphorylation of ERK1/2 was not increased by SSC. These results are representative of at least three independent experiments.

**Table I**

**Inhibition of adenosine, opioid and endothelin receptors and inhibition of nitric oxide synthase do not block the cytoprotective activity of conditioned medium**

Inhibitor	Ratio of viability of SSC+inhibitor/SSC+control	n	SSC+inhibitor vs SSC+control p > 0,05
Aminophylline	0.96 ± 0.05	15	p > 0,05
Naloxone	1.10 ± 0.16	7	p > 0,05
L-NAME (preconditioning)	1.02 ± 0.07	16	p > 0,05
L-NAME (serum starvation)	1.04 ± 0.10	16	p > 0.05
Bosentan	1.01 ± 0.08	8	p > 0,05

Viability was evaluated using crystal violet staining. Results are expressed as the ratio of (viability of HUVEC exposed to SSC+inhibitor) / (viability of HUVEC exposed to SSC+control).

**Table II**

**Effect of neutralizing antibodies for various growth factors and cytokines on the cytoprotective activity of SSC**

Antibodies (Ab)	Ratio of viability of SSC+Ab/SSC+control Ab	n	SSC+blocking Ab vs SSC+control Ab
Angiopoietin-1	1.02 ± 0.08	16	p > 0,05
Angiopoietin-2	1.01 ± 0.15	16	p > 0,05
bFGF	0.98 ± 0.08	15	p > 0,05
IGF-1	1.02 ± 0.10	15	p > 0,05
PDGF BB	1.02 ± 0.02	16	p > 0,05
VEGF	1.01 ± 0.10	40	p > 0,05
IL-1β	1.06 ± 0.06	8	p > 0,05

SSC was incubated for at least 1 hour with neutralizing antibodies or isotype-matched controls at room temperature followed by exposure to HUVEC for 24 hours. Viability



was evaluated using crystal violet staining. Results are expressed as the ratio of (viability of HUVEC exposed to SSC+blocking antibody) / (viability of HUVEC exposed to SSC+control antibody).

### **3.3 ARTICLE NO. 3**

#### **Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells**

PAR

Marc-André Raymond, Anik Désormeaux, Patrick Laplante, Normand Vigneault, Janos G. Filep, Karine Landry, Alexey V. Pshezhetsky et Marie-Josée Hébert

Publié dans

The FASEB Journal

Volume 18, 705-707 (2004)

**Avant propos:**

L'apoptose endothéliale est impliquée par différentes études comme étant importante dans l'initiation de l'épaississement myo-intimal et du remodelage vasculaire. Nous savons aussi qu'il existe une régulation opposée de l'apoptose des cellules musculaires lisses (CML) et des cellules endothéliales qui semblent impliquées aux sites d'insultes vasculaires tant au niveau macrovasculaire que microvasculaire. Suite aux travaux de l'article précédent, nous avons découvert que les cellules endothéliales en condition pro-apoptotiques relâchent des facteurs solubles qui peuvent induire des activités anti-apoptotiques, pro-prolifératives et pro-angiogéniques sur les cellules endothéliales. Selon notre hypothèse, l'apoptose endothéliale pourrait jouer un rôle dans le contrôle des dommages, suite à une insulte vasculaire et contribue à la réparation du vaisseau. Dans ce dernier article, nous avons étudié les effets du milieu sans sérum conditionné par des cellules endothéliales en condition pro-apoptotiques (SSC) sur une autre composante de la paroi vasculaire, les CML. Les CML jouent un rôle important dans le contrôle de la vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux, mais aussi dans la réparation des vaisseaux suite à une insulte par la prolifération. Nous avons découvert que le SSC induit une activité anti-apoptotique et pro-proliférative sur les CML. L'activité anti-apoptotique est associée à une activation de la voie ERK 1/2 qui stimule l'augmentation de l'expression de Bcl-xL. L'activité anti-apoptotique n'est pas médiée par une molécule connue pour son activité anti-apoptotique sur les CE ou les CML, mais nous avons découvert que la stimulation de l'apoptose des CE permet la relâche d'un fragment d'un protéoglycan, une partie du domaine V du perlécan. Le fragment du domaine V du

perlécan n'était pas connu comme ayant une activité anti-apoptotique sur les CML. Un peptide synthétique d'une partie du fragment du domaine V du perlécan et la sulfate de chondroïtine, qui possède un site d'ancrage sur ce fragment, possèdent eux aussi une activité anti-apoptotique sur les CML semblable à l'activité du milieu SSC. L'inhibition de l'apoptose et l'induction de la prolifération chez les CML par les facteurs solubles permettraient de favoriser la réparation des vaisseaux suite à une insulte par un épaissement myo-intimal et un remodelage vasculaire.

- Marc-André Raymond a contribué à l'élaboration intellectuelle du projet et à la planification expérimentale en laboratoire. Dans la partie sur la relâche de facteur (s) paracrin anti-apoptotique par l'apoptose des cellules endothéliales sur les VSMC, il a contribué à l'élaboration de la planification expérimentale, au développement et la mise au point de nouvelles techniques de laboratoire et à l'expérimentation. Au niveau du cycle cellulaire, il a participé à la planification expérimentale. Dans la partie sur la caractérisation des voies de signalisation anti-apoptotique activées par le milieu conditionné, il a contribué à l'élaboration de la planification expérimentale et à l'expérimentation. Dans la partie sur la caractérisation des médiateurs cytoprotecteurs présents dans le milieu conditionné, il a contribué à l'élaboration de la planification expérimentale de la caractérisation des médiateurs et à l'expérimentation sur les VSMC. Dans la partie sur la caractérisation du peptide synthétique et de la chondroïtine sulfate, il a contribué à l'élaboration de la planification expérimentale et à l'expérimentation. En collaboration avec le Dr Marie-Josée Hébert, il a aussi participé à l'écriture du manuscrit.

- Anik Désormeaux a contribué à la planification et a effectué l'expérimentation au niveau du cycle cellulaire.
- Patrick Laplante a effectué des expériences de coloration en fluorescence au hoechst et à l'iodure de propidium et il a aussi participé à la rédaction de l'article.
- Normand Vigneault a contribué aux expériences d'immunobavardage. Il a contribué à l'élaboration de la planification expérimentale de la caractérisation des médiateurs solubles du milieu SSC.
- Janos G. Filep a contribué à la planification de l'expérimentation pour l'analyse de la signalisation cellulaire.
- Karine Landry a effectué la caractérisation biochimique en FPLC dans le laboratoire du D<sup>r</sup> Pshezhetsky.
- Alexey V. Pshezhetsky a contribué à la planification et à la réalisation de la caractérisation biochimique dans son laboratoire.

## Abstract

Increased endothelial apoptosis and decreased apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC) are central to initiation of myo-intimal thickening. We hypothesized that apoptosis of endothelial cells (EC) induces the release of anti-apoptotic mediator(s) active on VSMC.

We found that serum-free medium conditioned by apoptotic EC decreases apoptosis of VSMC as compared with fresh serum-free medium. Inhibition of endothelial apoptosis during conditioning with a pan-caspase inhibitor, ZVAD-FMK blocked the release of the anti-apoptotic factor(s) active on VSMC. VSMC exposed to serum-free medium conditioned by apoptotic EC showed increased ERK 1/2 phosphorylation, enhanced Bcl-xl expression and inhibition of p53 expression. Fractionation of the conditioned medium followed by mass spectral analysis identified one bioactive component as a C-terminal fragment of the domain V of perlecan. Serum-free medium supplemented with either a synthetic peptide containing the EGF motif of the domain V of perlecan or chondroitin 4-sulfate, a glycosaminoglycan anchored on the domain V of perlecan, increased ERK 1/2 phosphorylation and Bcl-xl protein levels while inhibiting apoptosis of VSMC.

These results suggest that a proteolytic activity developing downstream of activated caspases in apoptotic EC initiates degradation of pericellular proteoglycans and liberation of bioactive fragments with a robust impact on inhibition of VSMC apoptosis.

**Key words:** endothelium, p53, Bcl-xl, extracellular signal-regulated kinase, perlecan

## Introduction

Disregulation of apoptosis and proliferation within the different cellular constituents of the vascular wall plays an important role in vascular remodeling associated with vascular fibroproliferative disorders such as atherosclerosis, hypertension and various forms of transplant vasculopathy (1-5). Endothelial injury is widely accepted as a crucial initiating event leading to vascular remodeling and myo-intimal thickening (6, 7). Apoptosis of endothelial cells (EC) is recognized as an important component of the "response to injury" phenomenon. Endothelial apoptosis is increased at sites of vascular injury in animal models of hypertension (8, 9), atherosclerosis (10) and transplant vasculopathy (3, 5). Also, classical risk factors for atherosclerosis, such as oxidized LDL (10-14), hyperglycemia (15, 16) and chemical components of cigarettes (17, 18) induce apoptosis of endothelial cells (EC) in vitro and in vivo.

Disregulation of apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMC) has also been demonstrated in various models of fibroproliferative vascular diseases. Initiation of myo-intimal thickening is characterized by migration and accumulation of VSMC within the intima. Acquisition of resistance to apoptosis and increased proliferative rates in vascular smooth muscle cells (VSMC) appear necessary for neointima formation (19-23). Decreased VSMC apoptosis and elevated levels of the anti-apoptotic gene product Bcl-x1 have been found within neointimal VSMC in models of



murine cardiac transplant vasculopathy (3), neointimal formation secondary to balloon-injury (19, 24) or polyethylene cuff placement (25) and at sites of myo-intimal thickening in human atherosclerotic lesions (19). Downregulation of Bcl-xl expression within intimal cell using antisense oligonucleotides enhanced VSMC apoptosis and prevented neointima formation in models of cardiac allograft vasculopathy and carotid balloon-injury (3, 19). Also, downregulation of p53, a pro-apoptotic gene product, was found to favor migration of VSMC from the tunica media to the intima and subsequent neointimal VSMC accumulation (26). Wild-type p53 gene transfer inhibited neointima formation by modulating VSMC migration and increasing apoptosis (27). Hence, mounting evidence suggests that acquisition of a state of resistance to apoptosis in VSMC is a pre-requisite for development of myo-intimal thickening.

The mechanisms that underlie the opposite regulations of apoptosis within endothelial and VSMC at sites of vascular damage are the scope of intense investigation. It is currently appreciated that injured EC fail to produce mediators such as prostacyclin and nitric oxide which would normally inhibit VSMC proliferation (7, 28). Hence it is assumed that endothelial injury allows development of myo-intimal thickening largely through lack of production of anti-proliferative mediators for VSMC. In the present study, we evaluated the possibility that endothelial apoptosis is associated with release of soluble mediator(s) which would in turn inhibit the molecular control of apoptosis in VSMC. We report that apoptosis of

EC leads to caspase-dependent release of novel paracrine mediator(s) with a robust impact on the regulation of apoptosis of VSMC.

## **Methods**

### ***Cell culture***

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human primary aortic vascular smooth muscle cells (AOSMC) were obtained from Clonetics (San Diego, CA, U.S.A.), grown in EGM and SmGM-2 culture media respectively and used at passages 2 to 4 (for HUVEC) and passages 2 to 6 (for AOSMC). A7R5 cells (rVSMC), a clonal smooth muscle cell line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, USA), were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (MEDICORP, QC, Canada).

### ***Viability assays and assessment of proliferation***

Cell viability was assayed using crystal violet (0.75%) in 30% acetic acid as we described previously (29, 30). In brief, cells were grown in gelatinized 96-well plates and exposed to the various experimental conditions. At the end of the incubation period, 10  $\mu$ l of 0.75% crystal violet/30% acetic acid was added to 100  $\mu$ l of medium/well for 10 min. The plates were washed, allowed to dry and the absorbance of each well, which is proportional to the amount of viable cells per well, was read at 550 nm with a AM OPSYS MR Dynex Technology Microplate Reader. Measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis was performed in sub-confluent rVSMC using Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) kit (Roche

Diagnostics GmbH, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer and as we described previously (30).

### *Screening for apoptosis with fluorescence microscopy*

For assessment of apoptosis we used fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilised EC stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (HT) and propidium iodide (PI) as described in our previous work (30-32). We showed that this technique accurately differentiates early apoptotic, late apoptotic and primary necrotic cells and is more accurate for evaluation of apoptosis than TUNEL assays (30-32). In brief, HUVEC were grown to confluence in 24-well gelatinized polycarbonate culture plates (Becton-Dickinson, NJ, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Following exposure to the various experimental conditions, HT was added (1 µg/ml for 10 min at 37°C). To prevent further uptake of HT, cells were washed with PBS. PI was added to each sample to a final concentration of 5 µg/ml, immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter  $\lambda = 360-425$  nm). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dish were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

Viable cells display normal nuclear and cytoplasmic morphology and stain blue. Early apoptotic cells are characterized by cell shrinkage, nuclear condensation

and preservation of plasma membrane integrity. Chromatin condensation is associated with enhanced fluorescence for HT (bright blue) whereas preservation of cell membrane integrity precludes PI staining. Late apoptotic cells (also called secondary necrosis) are characterized by presence of characteristic apoptotic nuclear changes and loss of cell membrane integrity associated with PI staining. Primary necrotic cells are characterized by increased cell size, absence of chromatin condensation and disruption of cell membrane integrity.

### ***Cell cycle analysis***

Cells were washed with PBS, trypsinized, resuspended in 1 ml of PBS/EDTA (1.1%) and fixed by addition of 4 ml of ice-cold 100% ethanol. Fixed cells were pelleted, washed with 4 ml of PBS/EDTA (1.1%), resuspended in a Sodium Citrate solution (1.12%) with RNase A (0.5 mg/ml) and incubated for 30 min. at 37°C. Propidium iodide (PI) (Molecular Probes) was then added to a final concentration of 0.05 mg/ml. The fraction of the cellular population in each phase of the cell cycle was determined as a function of DNA content using a FACScan flow cytometer equipped with CellFit software (Beckton Dickinson).

### ***Northern analysis of Bcl-xl and p53 RNA expression in VSMC exposed to SSC***

Total RNA was isolated using the Trizol method (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Reverse transcription polymerase chain reaction was used

to generate Bcl-x1, p53 and GAPDH probes. Briefly, RNA (3 µg) was reverse transcribed using random hexamer primers. Primers specific for Bcl-x1 (sense 5'-TGGTGGTCGACTTTCTCTCC-3'; antisense 5'-ATCCACAAAAGTGTCCCAGC-3'), p53 (sense 5'-GCTGAGTATCTGGACGACAG-3'; antisense 5'-CAGTGAAGGGACTAGCATTG-3'), GAPDH (sense 5'-CCCCACTAACATCAAATGGG-3'; antisense 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3') were used for PCR using 3 µl of cDNA reaction mixture, 200 µmol/L dNTP, 5 U of Taq polymerase with 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Burlington, ON, Canada) and 1 µmol/L of each primer. The thermocycle protocols were as follows for all probes: 95°C for 1 minute and 40 cycles at 94°C for 15 seconds, 64°C for 45 seconds, 72°C for 30 seconds and one final cycle at 72°C for 10 minutes. Products were cloned, digested with EcoR1 and labeled with <sup>32</sup>P for northern analysis as described previously (32).

#### ***Immunoblotting for Bcl-x1, p53 and ERK 1/2 in VSMC exposed to SSC***

Proteins were extracted as we described previously (30-32), separated on 12% SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed with one of the following monoclonal antibodies: anti-Bcl-x1 (PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), anti-non-phosphorylated and anti-phosphorylated ERK1/2 (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada), or anti-actin antibodies (Cedarlane, Hornby, ON, Canada).

### ***Characterization of paracrine mediators released by apoptotic endothelial cells***

Seven hundred and fifty (750) milliliters of serum free medium conditioned for four hours by apoptotic endothelial cells were concentrated on Amicon ultrafiltration membranes with a 1 kD and 10 kD cut-offs. The bioactive fraction was then dialyzed and loaded on the FPLC MonoQ anion-exchange column and eluted with 0-0.5 M NaCl gradient in a 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. Forty-six (46) 2-ml fractions were collected. An aliquot of each fraction was rediluted 1:10 in RPMI-1640 and exposed to rVSMC in culture with appropriate controls that included unprocessed conditioned medium and all fractions collected at the various isolation steps. The biological activity on rVSMC was quantified with a crystal violet assay. The fractions were then analyzed by SDS-PAGE using Tris-Tricine gels (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.), and stained with MS-compatible silver stain. Protein bands found specifically in the bioactive fraction were excised, digested with trypsin and subjected to mass spectral analysis using nano LC-MS-MS on a quadrupole/time-of-flight instrument (micromass Q-TOF II). Protein identification was conducted using Mascot (Matrix Science, London, U. K.) with NCBI protein database.

### ***Reagents***

LY294002, wortmannin, PD98059 and chondroitin 4-sulfate were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.). ZVAD-FMK and antibodies against IGF-

1, VEGF, PDGF BB, bFGF and IL-1 $\beta$  were purchased from R and D Systems (Minneapolis, MN, U.S.A.). The anti-HGF antibody was a gift of Dr J. Noël, Univ. of Montreal. The anti-TGF $\beta$ 1 antibody was from BioSource Int. (Nivelles, Belgium). Peptide synthesis was performed at the Biotechnology National Research Council of Canada (Montreal, Canada). All other reagents were from Sigma Chemicals (Oakville, ON, Canada).

### ***Statistical analysis***

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using Student's T-test or ANOVA, as appropriate. A  $P < 0.05$  was considered significant for all tests.



## Results

### **Apoptosis of EC is associated with caspase-dependent release of paracrine anti-apoptotic factor(s) for VSMC.**

Apoptosis of HUVEC was induced with serum-starvation for 4 hours as we previously described (30, 32). The serum-free medium conditioned by EC (SSC) was collected, centrifuged and used to serum starve rVSMC for 24 hours, followed by evaluation of apoptosis and proliferation. Development of apoptotic features was significantly decreased in rVSMC exposed to SSC as compared with fresh serum-free medium (SS) (Fig. 1A). Cell cycle analysis showed that rVSMC exposed to fresh serum-free medium develop a sub-G0 peak characteristic of apoptosis in association with an increased number of cells in G0/G1 phase (Fig. 1B). rVSMC exposed to SSC did not show significant increases in sub-G0 or G0/G1 phases, as compared with rVSMC exposed to normal medium (Fig. 1B). These results suggest that exposure to SSC maintains an active proliferative state in rVSMC and prevents both apoptosis and G1 arrest.

We then evaluated whether apoptosis of EC is a pre-requisite for release of this/these anti-apoptotic factor(s). We used pre-incubation of EC with ZVAD-FMK, a pan-caspase inhibitor to prevent development of endothelial apoptosis during

conditioning. HUVEC were exposed to ZVAD-FMK, (100  $\mu$ M) or vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) for 2 hours. ZVAD-FMK and vehicle were then removed and HUVEC were serum starved for 4 hours, followed by harvesting of the conditioned media and evaluation of apoptosis in HUVEC. Pre-incubation with ZVAD-FMK significantly decreased the percentage of apoptotic EC after 4 hours of serum starvation whereas pre-incubation with DMSO did not (Fig. 1C). These serum-free conditioned media were then used to serum-starve rVSMC and human AOSMC, followed by estimation of apoptosis. Serum-free medium conditioned by EC in which development of apoptosis was inhibited by pre-incubation with ZVAD-FMK failed to inhibit apoptosis of rVSMC and AOSMC (Fig. 1D) whereas serum-free medium conditioned by apoptotic endothelial cells did. These results suggest that release of paracrine anti-apoptotic mediator(s) occurs specifically in apoptotic EC downstream of caspase activation.

We also evaluated whether mediators produced by apoptotic EC may prevent against apoptotic stimuli other than growth factor deprivation. We found that the viability of rVSMC exposed for 24 hours to a DNA damaging agent, mitomycin C (0.01 mg/ml), was significantly increased in presence of SSC (viability of rVSMC exposed to RPMI+FBS 10 % + MMC: 44.5 %  $\pm$  1.3, viability of rVSMC exposed to SSC+FBS 10 % + MMC: 58.9  $\pm$  1.9 %,  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ )

**Mediator(s) released by apoptotic EC increase ERK 1/2 phosphorylation, enhance Bcl-xl expression and inhibit p53 expression in VSMC.**

Initiation of myo-intimal thickening has been associated with increased phosphorylation of ERK 1/2 (33, 34), increased expression of Bcl-xl (3, 19, 24) and decreased expression of p53 (26, 27) within myo-intimal cells. Hence we evaluated whether mediator(s) released by apoptotic EC regulate the expression of these gene products and pathways. We found that p53 mRNA levels were significantly decreased in rVSMC exposed to SSC for 24 hours, as compared with fresh serum-free medium (Fig. 1E). AOSMC showed a similar pattern, at the protein level, with increased protein levels of p53 after exposure to SS, whereas protein levels of p53 were not increased in AOSMC exposed to either SSC or normal medium (Fig. 1F). Increased expression of Bcl-xl, at the mRNA (Fig. 1E) and protein levels (Fig.1E) was found in rVSMC exposed to SSC for 24 hours. Again a similar pattern was found in human AOSMC with increased protein levels of Bcl-xl after exposure to SSC for 48 hours (Fig.1F). We also detected a rapid and sustained increase in phosphorylation of ERK 1/2 in rVSMC exposed to SSC (Fig. 1G).

We evaluated the functional consequences of ERK1/2 activation on resistance to apoptosis and Bcl-xl protein levels by preventing ERK 1/2 phosphorylation in VSMC with PD98059. Co-incubation with PD98059 inhibited the anti-apoptotic activity of SSC on rVSMC and AOSMC (Fig. 2 A and B). In keeping with an ERK

1/2 dependent anti-apoptotic pathway, PD98059 was found to prevent the induction of Bcl-xl at the protein level in rVSMC (Fig. 2C).

### **Characterisation of the anti-apoptotic mediator(s) released by apoptotic EC.**

We first evaluated whether apoptotic bodies could be implicated in the anti-apoptotic activity of medium conditioned by apoptotic EC. Depleting SSC of apoptotic bodies with high speed centrifugation failed to attenuate the anti-apoptotic activity of SSC on rVSMC (Fig. 3A). We also evaluated whether cytokines and growth factors known to regulate VSMC survival were released by apoptotic EC. Neutralizing antibodies for VEGF, bFGF, PDGF BB, IL-1 $\beta$ , HGF and TGF- $\beta$ 1 did not attenuate the anti-apoptotic activity of SSC on rVSMC as compared with SSC incubated with isotype-matched controls (data not shown). Also, bosentan, an antagonist of endothelin A and B receptors, did not inhibit the anti-apoptotic activity of SSC on rVSMC (data not shown).

To characterize the paracrine mediators released by apoptotic EC, 750 milliliters of SSC were concentrated and fractionated by ultrafiltration. The concentrated bioactive fraction was further fractionated by FPLC ion-exchange chromatography. Of the 46 fractions, only one showed a significant pro-survival activity on rVSMC (Fig. 3B). SDS-PAGE and silver staining revealed that this

fraction contained one ~23 kD protein band which was not present in the other fractions (Fig. 3C). This band was excised, digested by trypsin and identified by tandem mass spectrometry (MS/MS) as a fragment of the C-terminal domain V of perlecan (Fig. 3D).

**Chondroitin sulfate and a peptide containing the EGF motif of perlecan induce resistance to apoptosis in VSMC.**

Perlecan is a 467 kD modular proteoglycan composed of 5 distinct domains. The domain V of perlecan contains four EGF-like repeats and an anchoring site for chondroitin sulfate (35-37). Since a ~23 kD protein was found in the bioactive fraction, this suggested that native perlecan was not mediating the bioactivity and that proteolysis of perlecan was needed for liberation of a cryptic C-terminal fragment. In keeping with this hypothesis, we found that addition of native perlecan to serum-free medium did not inhibit apoptosis of serum-starved rVSMC (data not shown). Sequences identified by mass spectral analysis contained the C-terminal end of the domain V but did not allow precise identification of the N-terminal start of the fragment (Fig. 3D). Using ExpASY Molecular Biology Server we deduced an approximative N-terminal cleavage site based on a molecular weight of  $23 \pm 2$  kD and determined that the chondroitin 4-sulfate anchoring site and one EGF-motif were part of the fragment isolated in SSC. Supplementation of serum-free medium with either chondroitin 4-sulfate or a synthetic peptide containing the EGF-motif sequence

of perlecan domain V (CQLREPCLHGGTCQGTRCLCLPGFSGPRCQQGSGHG) significantly reduced development of apoptosis in rVSMC (Fig. 4A) and AOSMC (Fig. 4E). However, neither chondroitin 4-sulfate nor the synthetic peptide induced proliferation of rVSMC (Fig. 4B), suggesting that these compounds may be implicated in the anti-apoptotic activity of SSC but not in its pro-proliferative activity. Chondroitin 4-sulfate and the synthesized peptide induced sustained ERK 1/2 phosphorylation in rVSMC (Fig. 4C) and both compounds increased protein levels of Bcl-xl in rVSMC and AOSMC (Fig. 4D). In keeping with an ERK 1/2-dependent anti-apoptotic phenotype, we found that co-incubation of either rVSMC or AOSMC with PD98059 blocked the anti-apoptotic activity of SSC, chondroitin 4-sulfate and the synthesized peptide (Fig. 4E). However, exposure to chondroitin 4-sulfate or the synthetic peptide failed to prevent stabilisation of p53 at the protein level in AOSMC (Fig. 4F). Hence, these results suggest that motifs present in the domain V of perlecan mimic the anti-apoptotic activity of SSC on VSMC whereas other mediators, yet to be identified regulate p53 protein level and cell cycle reentry.

## Discussion

Mounting evidence suggests that increased levels of endothelial apoptosis and resistance to apoptosis in VSMC are two key contributive factors allowing initiation of neointimal formation and myo-intimal thickening (6-10). Mechanisms responsible for opposite regulations of apoptosis in endothelial and smooth muscle cells at sites of vascular injury are still largely undefined. We propose that apoptosis of EC is a key element that triggers the release of bioactive mediators favoring development of a state of resistance to apoptosis in VSMC. Our results shed new light on the work of Karnovsky and colleagues, dating back to the early '80s, that suggested that endothelial cells, under certain growth condition, may produce mediators favoring or inhibiting growth of VSMC (38, 39).

We show that apoptotic EC release mediator(s) that inhibit apoptosis of VSMC whereas normal EC do not. The pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK inhibited caspase-dependent apoptosis in endothelial cells during conditioning but did not prevent development of caspase-independent apoptosis-like programmed cell death in endothelial cells. Yet, pre-incubation with ZVAD-FMK blocked completely the release of anti-apoptotic factors by endothelial cells. We propose that "caspase activation per se" and not "programmed cell death in general" is responsible for the release of paracrine anti-apoptotic factors active on VSMC. Our results suggest that release of paracrine anti-apoptotic factors occurs downstream of caspase activation

and does not occur in association with caspase-independent apoptosis-like endothelial programmed cell death.

A wealth of recent reports show that apoptosis is redundantly inhibited at the molecular level in VSMC during initiation of myo-intimal thickening. Increased expression of Bcl-xl within intimal cells and decreased p53 expression accelerate development of myo-intimal thickening in human and animal models of atherosclerosis (3, 19, 23-27). Also, recent reports suggest that activation of ERK 1/2, an important anti-apoptotic and growth promoting signaling pathway in VSMC (33), is required for development of myo-intimal thickening in vivo (34). Intriguingly, our results suggest that mediator(s) released by apoptotic EC modulate(s) precisely the expression and activation of these genes and pathways in VSMC. We found that expression of Bcl-xl is increased, both at the mRNA and protein levels, in VSMC exposed to medium conditioned by apoptotic EC whereas expression of p53 is suppressed. We also found that medium conditioned by apoptotic EC induces rapid and sustained ERK1/2 phosphorylation in VSMC. Hence, signaling pathways and the protein and gene expression patterns induced by this anti-apoptotic loop parallel that of known molecular risk factors for myo-intimal thickening.

We performed a series of experiments to assess whether known mediators with anti-apoptotic activity are components of this anti-apoptotic loop. While previous studies have suggested a paracrine anti-apoptotic role for IGF-1 in



mesangial and neuronal cells (40, 41) and for apoptotic bodies in monocytic cells (42), the present results exclude the involvement of these mediators to the anti-apoptotic loop activated in association with EC apoptosis. We also tested the possibility that growth factors and cytokines implicated in the regulation of apoptosis in cellular constituents of the vessel wall may be responsible for this anti-apoptotic activity (7). Function blocking antibodies to VEGF, bFGF, PDGF BB, IL-1 $\beta$ , HGF and TGF- $\beta$ 1 and blockade of endothelin receptors A and B failed to attenuate this anti-apoptotic activity, thereby excluding the contribution of these mediators to this anti-apoptotic loop.

Further characterization of the bioactive mediator(s) with fractionation of conditioned medium yielded one bioactive fraction, which was further analysed by SDS-PAGE. We found one ~23 kD prominent protein band, present only in the bioactive fraction, and identical to the C-terminal domain V of perlecan. Perlecan is a 467 kD proteoglycan composed of 5 distinct domains (35-37). The C-terminal domain of perlecan (domain V), contains an anchoring site for chondroitin sulfate and three laminin-type G modules separated by four EGF-like modules. The bioactive fraction isolated from medium conditioned by apoptotic EC did not contain any components of perlecan other than a fragment of the C-terminal end of domain V. Also, fractions of conditioned medium containing mediators with a molecular weight higher than 50 kD were not bioactive on VSMC, suggesting that native perlecan is not implicated in the bioactivity of conditioned medium on VSMC. Hence our results suggest that proteolytic enzymes activated during apoptosis of EC would be

responsible for liberation of a truncated form of perlecan active on VSMC. Consistent with this contention, our results showed that native perlecan does not inhibit apoptosis of VSMC whereas both a synthetic peptide containing the EGF-motif present in the domain V of perlecan and chondroitin 4-sulfate inhibited the development of apoptosis in VSMC. Also, both chondroitin 4-sulfate and the synthetic peptide induced sustained ERK 1/2 phosphorylation and increased Bcl-xl protein levels in VSMC. Blockade of ERK 1/2 in VSMC prevented development of an anti-apoptotic phenotype. Hence, these results suggest that motifs present in the domain V of perlecan induce an anti-apoptotic phenotype in VSMC.

The enzymes responsible for the proteolysis of perlecan during apoptosis of endothelial cells have yet to be characterized. We showed that this paracrine anti-apoptotic activity does not develop in endothelial cells in presence of pan-caspase inhibition, yet evaluation of the amino acid sequence of perlecan did not reveal any caspase cleavage site. Thus, activated caspases would not be implicated directly in the proteolysis of the domain V of perlecan. Rather our results suggest that an endoprotease(s) yet uncharacterized, activated downstream of caspases in apoptotic endothelial cells, is responsible for the proteolysis of perlecan. Proteolysis of basement membrane components (such as collagen IV, XV and XVIII) and liberation of cryptic bioactive factors (such as tumstatin, arrestin and endostatin) have been implicated in the control of angiogenesis (43, 44). Our results suggest that a similar phenomenon takes place during endothelial apoptosis with proteolysis of pericellular proteoglycans and liberation of a cryptic anti-apoptotic factor active on VSMC.

During apoptosis, cells shrink and detach from the extracellular matrix in order to be efficiently phagocytosed by neighboring professional or non-professional phagocytes. We propose that proteolysis of the extra-cellular matrix by apoptotic endothelial cells is as a necessary initial step that allows detachment from the extra-cellular matrix and subsequent phagocytosis or physical detachment of the apoptotic cell from the vessel wall. Hence, proteolysis of the extra-cellular matrix and release of a bioactive fragment of perlecan would occur before the apoptotic cell is taken away by either flow or phagocytosis

We reported previously that apoptotic endothelial cells release factors that inhibit apoptosis of neighboring surviving endothelial cells and promote angiogenesis (30). Based on these results and our present work, we propose that endothelial apoptosis triggers the release of paracrine mediators that control cellularity and healing of the vessel wall. The autocrine loop active on EC may represent an adaptive response that protects the endothelium against widespread cell death and initiates reendothelialisation. However, the paracrine loop active on VSMC would favor accumulation of VSMC within the vessel wall and myo-intimal thickening. Sustained activation of this paracrine loop may form the basis of a maladaptive response that would ultimately foster pathological remodeling at sites of chronic vascular injury.

## **Acknowledgments**

This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant # MT-15447) and the Kidney Foundation of Canada to MJH and by CIHR grant (MT-38107) and Genome Quebec/Genome Canada grant to AP. MJH is a scholar of the CIHR. We thank the Fondation J. L. Lévesques and the Fondation CHUM for their support. We thank Dr Pavel Hamet for helpful discussions and comments. We also thank Dr. Alexander Bell and Dr. Daniel Boismenu for the help with the MS analysis

## References

1. Walsh, K., and Isner, J. M. (2000) Apoptosis in inflammatory - fibroproliferative disorders of the vessel wall. *Cardiovascular Res* 45, 756-765
2. Walsh, K., Smith, R. C., and Kim, H. (2000) Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res* 87, 184-188
3. Suzuki, J., Isobe, M., Morishita, R., Nishikawa, T., Amano, J., and Kaneda, Y. (2000) Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovascular Res* 45, 783-787
4. Hamet, P. (1995) Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4, 1-7
5. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D., and Colvin, R. (2002) Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* 2002 Jun;82(6):673-86 82, 673-686
6. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126
7. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241
8. Hamet, P., and deBlois, D. (2001) Endothelial and myocyte apoptosis--role of angiotensin II. *Can J Cardiol* 17, Suppl A:26A-28A

9. Vogt, C., and Schmid-Schonbein, G. (2001) Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. *Microcirculation* 8, 129-139
10. Sata, M., and Walsh, K. (1998) Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102, 1682-1689
11. Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., and Zeiher, A. (1997) Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95(7), 1760-1763
12. Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Pieraggi, M., Arnal, J., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1997) Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurointricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 331-339
13. Harada-Shiba, M., Kinoshita, M., Kamido, H., and Shimokado, K. (1998) Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 273, 9681-9687
14. Li, D., Yang, B., and Mehta, J. (1998) Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 275, H568-H576
15. Du, X., Sui, G., Stockklauser-Farber, K., Weiss, J., Zink, S., Schwippert, B., Wu, Q., Tschöpe, D., and Rosen, P. (1998) Introduction of apoptosis by high

proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia* 41(3), 249-256

16. Baumgartner-Parzer, S. L., Wagner, M., Pettermann, J., Grillari, A., Gessl, A., and Waldhausl, W. (1995) High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44, 1323-1327

17. Tithof, P., Elgayyar, M., Cho, Y., Guan, W., Fisher, A., and Peters-Golden, M. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism. *FASEB J* 16, 1463-1464

18. Wang, J., Wilcken, D., and Wang, X. (2001) Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells. *Mol Genet Metab* 72, 82-88

19. Pollman, M., Hall, J., Mann, M., Zhang, L., and Gibbons, G. (1998) Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 4, 222-227

20. Diez, J., Fortuno, M., Zalba, G., Etayo, J., Fortuno, A., Ravassa, S., and Beaumont, J. (1998) Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J Suppl G*, G29-G33

21. Malik, N., Francis, S., Holt, C., Gunn, J., Thomas, G., Shepherd, L., Chamberlain, J., Newman, C., Cumberland, D., and Crossman, D. (1998) Apoptosis

and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 98(16), 1657-1665

22. Sata, M., Perlman, H., Muruve, D., Silver, M., Ikebe, M., Libermann, T., Oettgen, P., and Walsh, K. (1998) Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3), 1213-1217

23. Guevara, N., Kim, H., Antonova, E., and Chan, L. (1999) The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5, 335-339

24. Pollman, M. J., Hall, J. L., and Gibbons, G. H. (1999) Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res* 84, 113-121

25. Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Hamada, M., Hiwada, K., and Horiuchi, M. (2002) Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 106, 847-853

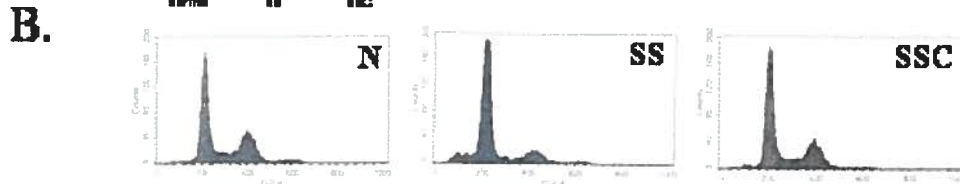
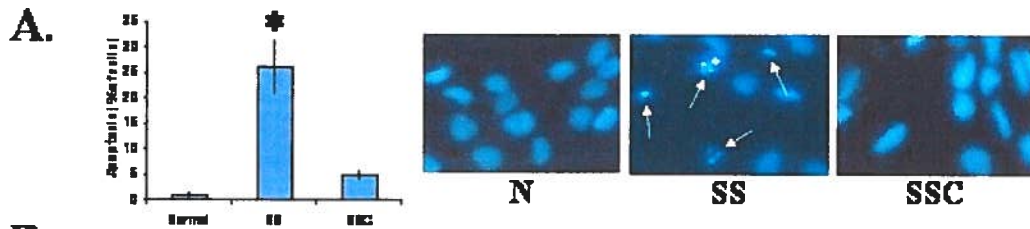
26. Rodriguez-Campos, A., Ruiz-Enriquez, P., Faraudo, S., and Badimon, L. (2001) Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 214-219



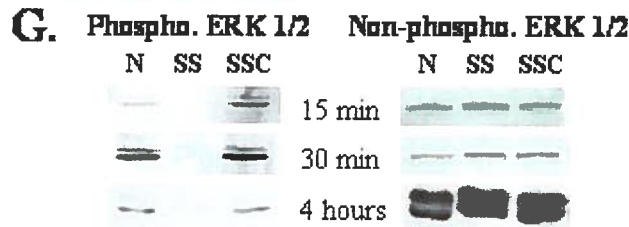
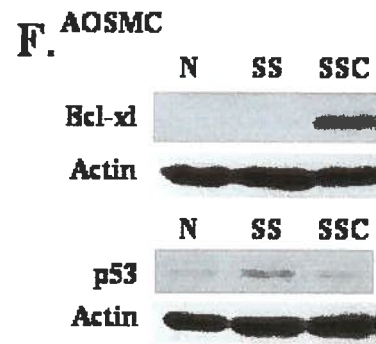
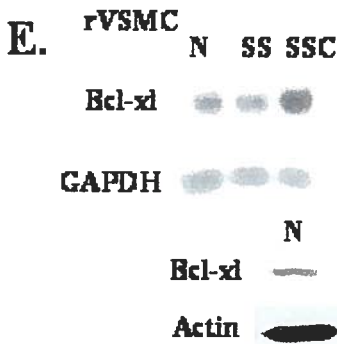
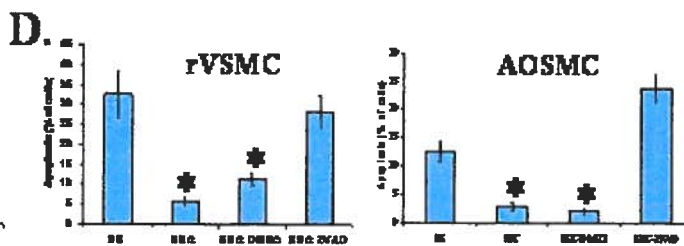
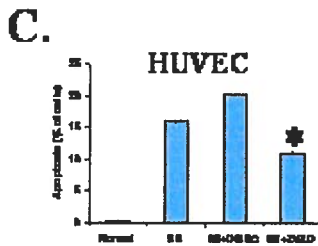
27. George, S., Angelini, G., Capogrossi, M., and Baker, A. (2001) Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther* 8, 668-676
28. Lopez-Farre, A., Rodriguez-Feo, J., Sanchez de Miguel, L., Rico, L., and Casado, S. (1998) Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1095-1106
29. Santos, B. C., Chevaile, A., Hebert, M. J., Zagajeski, J., and Gullans, S. R. (1998) A combination of NaCl and urea enhances survival of IMCD cells to hyperosmolality. *Am J Physiol* 274, F1167-F1173
30. Raymond, M., Vigneault, N., Luyckx, V., and Hebert, M. (2002) Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 261-269
31. Raymond, M., Mollica, L., Vigneault, N., Desormeaux, A., Chan, J., Filep, J., and Hebert, M. (2003) Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB J* 17, 515-517
32. Hébert, M., Gullans, S., Mackenzie, H., and Brady, H. (1998) Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an IL-1B-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 152, 523-532

33. Shichiri, M., Yokokura, M., Marumo, F., and Hirata, Y. (2000) Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 4, 989-997
34. Hu, Y., Dietrich, H., Metzler, B., Wick, G., and Xu, Q. (2000) Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 18-26
35. Cohen, I. R., Grassel, S., Murdoch, A. D., and Iozzo, R. V. (1993) Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10404-10404
36. Kallunki, P., and Tryggvason, K. (1992) Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules and epidermal growth factor. *J Cell Bio* 116, 559-571
37. Mongiat, M., Sweeney, S. M., San Antonio, J. D., Fu, J., and Iozzo, R. V. (2003) Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* 278, 4238-4249
38. Castellot, K. J., Addonizio, M. L., Rosenberg, R., and Karnovsky, M. J. (1981) Cultured endothelial cells produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle growth. *J Cell Biol* 90, 372-379

39. Karnovsky, M. J. (1981) Endothelial - vascular smooth muscle cell interactions. *Am J Pathol* 105, 200-206
40. Mooney, A., Jobson, T., Bacon, R., Kitamura, M., and Savill, J. (1997) Cytokines promote glomerular mesangial cell survival in vitro by stimulus-dependent inhibition of apoptosis. *J Immunol* 159(8), 3949-3960
41. Gluckman, P. D., Guan, J., Williams, C., Scheepens, A., Zhang, R., Bennet, L., and Gunn, A. (1998) Asphyxial brain injury -- the role of the IGF system. *Mol Cell Endocrinol* 140, 95-99
42. Reddy, S. M., Koh, J. S., Abernethy, V. E., Wang, Z., and Levine, J. S. (1999) Uptake of apoptotic cells and bodies promotes the survival of phagocytic cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 519A
43. Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 422-433
44. Iozzo, R. V., and San Antonio, J. D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108, 349-355



	sub G0	G0/G1	S	G2/M
N	2,39	58,64	13,72	21,72
SS	8,55*	73,25*	5,58*	10,24*
SSC	2,92	61,83	11,90	20,09



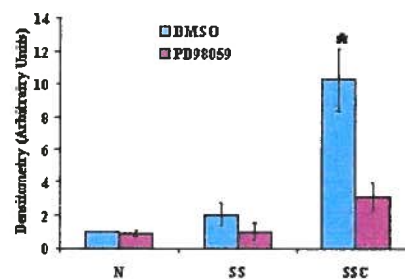
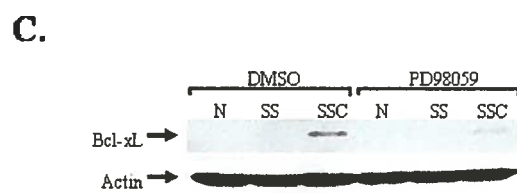
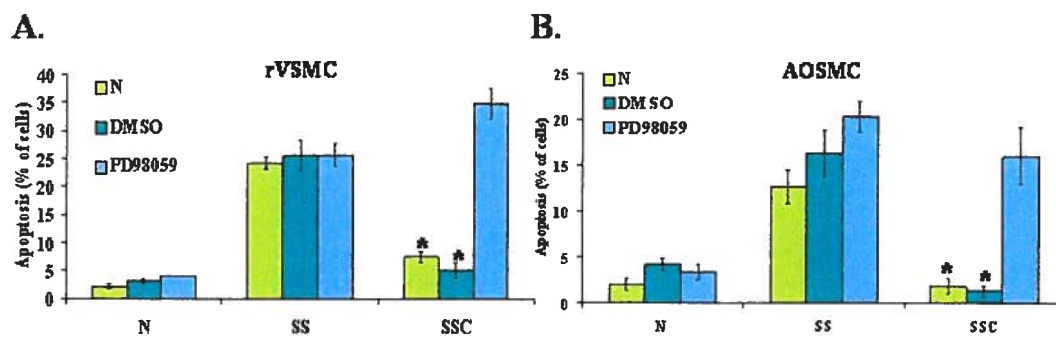
**Figure 1.**

**A.** Left panel. Percentage of apoptotic cells in rVSMC exposed for 24 hours to normal medium (N), serum-starvation (SS) or serum-free medium conditioned by HUVEC (SSC). \*  $p < 0.01$  vs N,  $n \geq 4$ . Right panel. Representative micrographs of rVSMC exposed for 24 hours to N, SS or SSC, followed by staining with Hoechst 33342 (HT) and propidium iodide (PI). (Magnification 400 X). Arrows point to apoptotic cells. **B.** Upper panel. Cell cycle analysis of rVSMC exposed for 16 hours to N, SS or SSC. Lower panel. Percentage of rVSMC in the different phases of the cell cycle \*  $p < 0.006$  vs N,  $n = 6$  per condition. **C.** Percentage of apoptotic cells in normal HUVEC (N), HUVEC serum-starved for 4 hours (SS), HUVEC pre-incubated with normal medium containing either ZVAD-FMK or DMSO for 2 hours and then exposed for 4 hours to serum-free medium (respectively SS+ZVAD and SS+DMSO). Pre-incubation with ZVAD-FMK significantly attenuated development of apoptosis in HUVEC as compared with pre-incubation with DMSO. SS+ ZVAD vs SS+ DMSO:  $p = 0.02$ ,  $n = 12$ . **D.** Left panel. Percentage of apoptotic cells in rVSMC exposed for 24 hours to serum-free medium (SS), medium conditioned by apoptotic HUVEC (SSC), medium conditioned by apoptotic HUVEC pre-incubated with DMSO (SSC+DMSO) or medium conditioned by HUVEC in which apoptosis was inhibited (SSC+ZVAD). SSC + ZVAD vs SSC + DMSO:  $p = 0.0025$ ,  $n = 6$ . Right panel. Percentage of apoptosis in AOSMC exposed for 48 hours to serum-free medium (SS), medium conditioned by apoptotic HUVEC (SSC), medium conditioned by apoptotic HUVEC pre-incubated with DMSO (SSC+DMSO) or medium

conditioned by HUVEC in which apoptosis was inhibited (SSC+ZVAD). SSC + ZVAD vs SSC + DMSO:  $p < 0.05$ ,  $n \geq 9$ . **E.** Upper panel. Northern analysis. Increased expression of Bcl-xl and decreased expression of p53 in rVSMC exposed to SSC for 24 hours, as compared with both N and SS. Lower panel. Immunoblotting analysis. Increased protein level of Bcl-xl in rVSMC exposed to SSC for 24 hours, as compared with SS. The results are representative of three independent experiments.

**F.** Immunoblotting analysis. Upper panel. Increased protein level of Bcl-xl in AOSMC exposed to SSC for 48 hours, as compared with both N and SS. Lower panel. Decreased protein level of p53 in AOSMC exposed to SSC for 48 hours, as compared with SS. The results are representative of three independent experiments.

**G.** Immunoblotting analysis. Increased levels of phosphorylated ERK 1/2 in rVSMC exposed to SSC for 15 min, 30 min and 4 hours, as compared with SS. The results are representative of three independent experiments.



**Figure 2.**

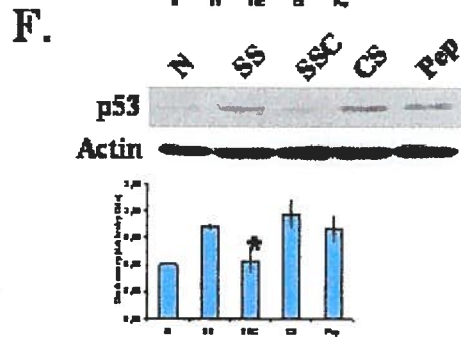
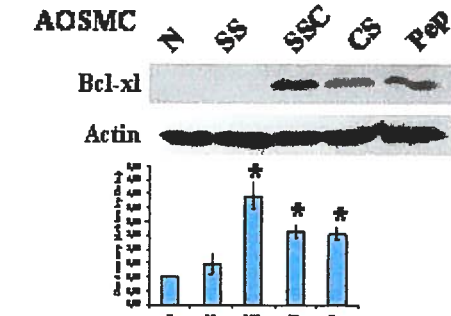
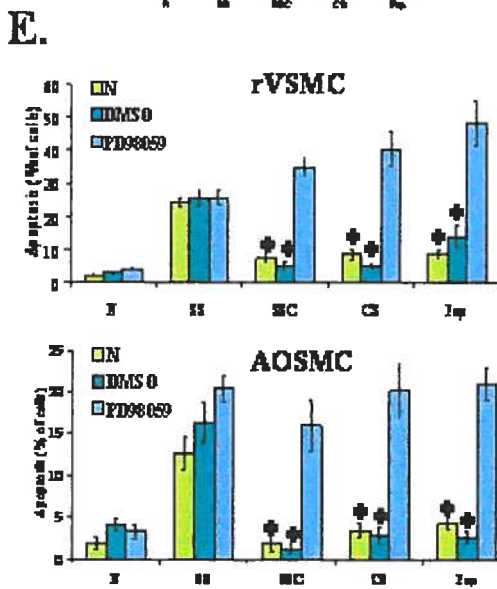
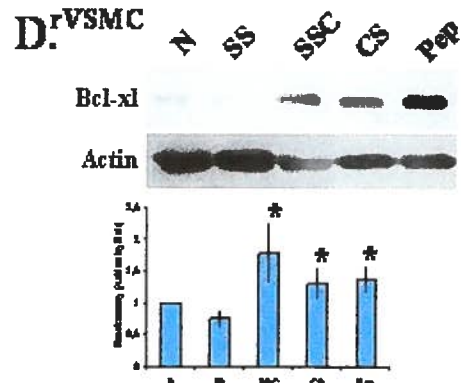
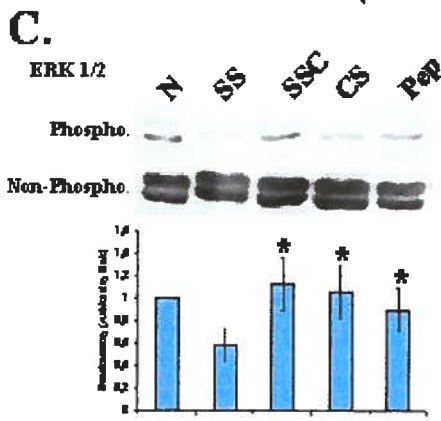
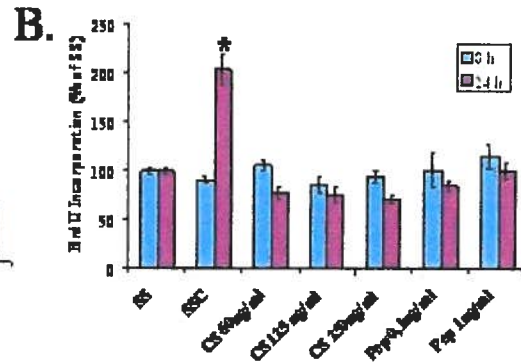
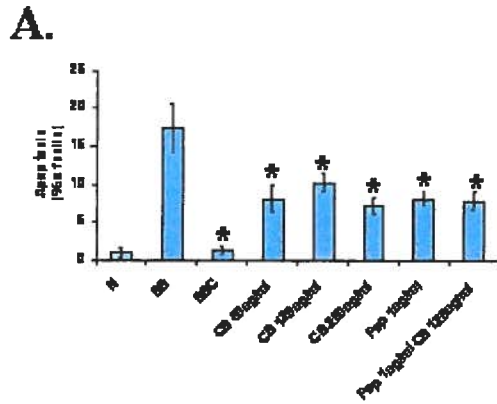
**A.** Percentage of apoptotic cells in rVSMC exposed for 24 hours to normal medium (N), serum-starvation (SS) or serum-free medium conditioned by HUVEC (SSC), either alone, with an inhibitor of the ERK1/2 (PD98059, 50  $\mu$ M) or his vehicle (DMSO). \*  $p < 0.05$  vs SS,  $n \geq 9$ . **B.** Percentage of apoptotic cells in AOSMC exposed for 48 hours to normal medium (N), serum-starvation (SS) or serum-free medium conditioned by HUVEC (SSC), either alone, with an inhibitor of the ERK1/2 (PD98059, 50  $\mu$ M) or his vehicle (DMSO). \*  $p < 0.05$  vs SS,  $n \geq 6$ . **C.** Immunoblotting analysis and densitometry. Decreased protein level of Bcl-xl was found in rVSMC exposed to SSC with PD98059 for 24 hours, as compared with SSC with DMSO. \*  $p < 0.05$ ,  $n \geq 3$ .





**Figure 3.**

**A.** Apoptotic bodies. Serum-free medium was depleted of apoptotic bodies with high speed centrifugation (SSC w/o apoptotic bodies), and apoptotic bodies were resuspended in fresh serum free medium (SS + apoptotic bodies). rVSMC were exposed to the different conditions for 24 hours and viability was evaluated with a crystal violet assay. Serum-free medium conditioned by HUVEC (SSC) and SSC w/o apoptotic bodies significantly increased the viability of rVSMC whereas SS + apoptotic bodies did not. \*  $p < 0.05$ ,  $n \geq 8$ . **B.** UV chromatography pattern of the various fractions and level of anti-apoptotic activity of each fractions on rVSMC. Only one fraction significantly increased rVSMC viability as compared with fresh serum-free medium. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ . **C.** SDS-PAGE and silver staining of the bioactive and adjacent fractions. The arrow points to a ~23 kD band present exclusively in the bioactive fraction. **D.** Identification of the major protein in the bioactive fraction as a C-terminal fragment of the domain V of perlecan by nano LC-MS-MS. Upper panel. Product ion scan of the precursor ion with Mr 1052.56 Da. Collisional activation was obtained using Ar as a target gas at collision energy of 60 eV. Lower panel. Sequence coverage and individual Mascot scores for the peptides identified from the tandem mass spectra. The underlined sequences of amino acids have been found in two independent experiments.



**Figure 4.**

**A.** Percentage of apoptotic cells in rVSMC exposed for 24 hours to serum-free medium supplemented with chondroitin 4-sulfate (CS 60  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$  or 250  $\mu\text{g/ml}$ ), or synthetic peptide (Pep, 1  $\mu\text{g/ml}$ ). \*  $p < 0.05$  as compared with SS.  $n \geq 4$ .

**B.** BrdU incorporation in rVSMC exposed to SS, SSC, serum-free medium supplemented with either chondroitin 4-sulfate (60  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$  or 250  $\mu\text{g/ml}$ ), or synthetic peptide (Pep, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 8 or 24 hours. Only SSC was associated with a significant proliferative response. \*  $p < 0.0001$  as compared with SS.  $n = 12$ .

**C.** Immunoblotting analysis for phosphorylated and non-phosphorylated forms of ERK 1/2 in rVSMC exposed for 4 hours to N, SS, SSC, chondroitin 4-sulfate (CS, 125  $\mu\text{g/ml}$ ) or synthetic peptide (1  $\mu\text{g/ml}$ ), as compared with SS. \*  $p < 0.05$  vs SS.

**D.** Immunoblotting for Bcl-x1. Upper panel. Increased protein levels of Bcl-x1 were found in rVSMC exposed to SSC, chondroitin 4-sulfate (CS, 125  $\mu\text{g/ml}$ ) and synthetic peptide (Pep, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours, as compared with SS. \*  $p < 0.05$  vs SS. Lower panel. Increased protein levels of Bcl-x1 were found in AOSMC exposed to SSC, chondroitin 4-sulfate (CS, 125  $\mu\text{g/ml}$ ) and synthetic peptide (Pep, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 48 hours, as compared with SS. \*  $p < 0.05$  vs SS.

**E.** Upper panel. Percentage of apoptotic cells in rVSMC exposed for 24 hours to normal medium (N), serum-starvation (SS), serum-free medium conditioned by HUVEC (SSC), serum-free medium supplemented with chondroitin 4-sulfate (CS, 125  $\mu\text{g/ml}$ ) or synthetic

peptide (1  $\mu\text{g/ml}$ ), either alone, with PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (DMSO). \*  $p < 0.05$  vs SS,  $n \geq 9$ . Lower panel. Percentage of apoptotic cells in AOSMC exposed for 48 hours to N, SS, SSC, CS (125  $\mu\text{g/ml}$ ) or pep (1  $\mu\text{g/ml}$ ), either alone, with PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (DMSO). \*  $p < 0.05$  vs SS,  $n \geq 6$ . F. Immunoblot analysis. Decreased protein level of p53 was found in AOSMC exposed to SSC for 48 hours, as compared with SS. \*  $p < 0.05$  vs SS.

## **4 DISCUSSION**

Nous savons que l'insulte endothéliale est généralement acceptée comme un événement initiateur crucial pour le remodelage vasculaire. En fait, une dysfonction de l'endothélium est associée avec l'initiation du développement de maladie vasculaire, comme l'athérosclérose et la microangiopathie thrombotique, qui mène à un remodelage vasculaire et à un épaissement myo-intimal pathologique [190-193, 293, 383, 384]. Cependant, l'inhibition de l'apoptose ne semble pas résoudre le problème. La CsA, un agent immunosuppresseur, peut inhiber l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* [10, 433], mais son utilisation chez l'humain peut entraîner des complications qui mènent au développement de thrombus intra-rénaux semblables à ceux retrouvés chez les microangiopathies thrombotiques [441, 448, 450]. Cependant, l'atteinte vasculaire engendrée par la CsA est artérielle [450] et aucune étude *in vitro* n'a été effectuée sur l'effet de la CsA sur les cellules endothéliales artérielles.

Il est aussi possible que l'apoptose endothéliale joue un rôle dans le contrôle des dommages suite à une insulte vasculaire et contribue à la réparation du vaisseau. L'apoptose endothéliale pourrait être impliquée dans des mécanismes de gestion des dommages. L'apoptose pourrait donc jouer un rôle de régulation sur l'environnement local vasculaire, selon un processus semblable à l'hypothèse proposée par David L. Vaux [480]. L'hypothèse propose que l'apoptose des cellules, suite à une infection virale, serve de mécanisme de défense pour les cellules voisines. Les cellules apoptotiques relâchent de  $Il-1\beta$  pour avertir les cellules environnantes de l'infection virale et les stimulent à se protéger [480]. Nous commençons à mieux comprendre les

mécanismes intracellulaires de régulation de l'apoptose [18, 19], mais les effets de l'apoptose cellulaire sur l'environnement local ne sont pas caractérisés. Nous savons aussi qu'il existe une régulation opposée de l'apoptose des CML et des CE qui semblent impliquées aux sites d'insultes vasculaires [293] tant au niveau macrovasculaire que microvasculaire. Nous avons donc évalué l'hypothèse que l'apoptose des CE stimule la relâche de médiateurs solubles bioactifs qui initient la réparation vasculaire. Selon notre hypothèse, l'inhibition de l'apoptose pourrait favoriser l'émergence d'une autre voie de mort cellulaire et ainsi réduire le potentiel de réparation des vaisseaux.

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu déterminer l'effet de la CsA sur les cellules endothéliales humaine d'origine artérielle (CEA). Nous avons découvert que la viabilité des CEA est réduite, lorsque exposée à la CsA. Pour vérifier l'effet de la CsA sur l'inhibition de l'apoptose, nous avons induit l'apoptose des CEA avec de la mitomycine C (MMC), un agent qui endommage l'ADN et induit l'apoptose [195, 481], et exposé ces cellules apoptotiques à de la CsA. La MMC est un agent chimiothérapeutique qui se retrouve souvent utilisé avant la CsA dans des cas de transplantation de moelle osseuse. Lors de transplantation, la moelle du receveur est détruite par chimiothérapie avant la transplantation et elle est suivie par l'utilisation d'immunosuppresseur. Nous avons constaté une diminution de l'apoptose induite par la MMC suite à l'ajout de la CsA, mais aussi une plus grande quantité de cellules à morphologie nécrotique. Chez les CEA exposées à la CsA seule, on retrouve aussi plus de cellules à morphologie nécrotique. La CsA inhibe le processus apoptotique des CEA, mais favorise le développement d'une mort cellulaire à



morphologie nécrotique. Nous avons découvert que les caspases ne sont pas impliquées dans la régulation de la mort nécrotique induite par la CsA et confirmons les résultats de Ferri et Kroemer en 2001 qui suggéraient que l'apoptose induite par le dommage à l'ADN se produisait en absence du clivage des caspase-1 et -8 [82].

Nous savons que la CsA joue deux rôles d'inhibition dans la cellule : elle inhibe la calcineurine pour médier son activité immunosuppressive [423] et elle bloque le PTP en interagissant avec la cyclophiline D pour former son complexe actif [10, 103, 433]. Nous avons exposé les CEA au tacrolimus, un autre inhibiteur de la calcineurine [482, 483]. Le tacrolimus n'induit pas la mort des CEA et ne redirige pas l'apoptose des CEA vers une forme nécrotique. En exposant les CEA à de l'acide bongkréique, un ligand et inhibiteur de ANT [484], pour mimer l'effet de la CsA, nous observons une induction de nécrose chez les CEA. Il semble que le blocage d'ANT prédispose les CEA au développement d'un mode de mort cellulaire non-apoptotique. Comme ANT est bloquée, il ne peut y avoir d'échange d'ATP et d'ADP entre le cytoplasme et la mitochondrie [90-94]. Nous avons découvert que le ratio ATP/ADP est diminué chez les CEA exposées à la CsA. En absence de substrat, la chaîne respiratoire mitochondriale peut générer des anions superoxydes et augmenter les radicaux réactifs d'oxygène dans la cellule [90, 95, 96].

Navarro-Antolin et al. ont démontré que la CsA peut induire la production de radicaux réactifs d'oxygène et de peroxy-nitrite chez des cellules endothéliales bovine [439]. Nous avons découvert que la CsA induit une augmentation rapide dans la formation de NO et d'oxygène réactif, suivit par la suite par une augmentation de

peroxynitrite chez les CEA. Nous savons que des dommages lysosomiaux et l'activation de protéases lysosomiales peuvent survenir suite au stress oxydatif à la fois en apoptose et en nécrose [16, 150, 485]. Nous avons découvert un dommage lysosomal chez les CEA exposées à la CsA, mais après la production d'espèces réactives d'oxygène. La mort cellulaire nécrotique induite par la CsA conserve donc les caractéristiques d'une mort cellulaire programmée, puisque des inhibiteurs chimiques précis, contre les anions superoxydes ou la cathepsine D, peuvent bloquer la mort cellulaire induite par la CsA sans interférer avec l'événement initiateur [16].

Nos résultats sont importants, puisqu'ils aident à clarifier une controverse, qui existe dans la littérature, au sujet de l'activité de la CsA sur les cellules endothéliales. Il a été démontré que la CsA pouvait avoir un effet anti-apoptotique sur les CE, mais les techniques utilisées ne ciblaient que l'apoptose et ne mesuraient pas les autres formes de mort cellulaires [433]. D'autres équipes parlent d'un effet pro-apoptotique de la CsA en utilisant des techniques d'observation de la mort cellulaire en générale [393, 394, 433, 438]. Ces équipes ont étudié les effets de la CsA sur des CE d'origine veineuse, alors que la CsA est associée à des complications au niveau artérielle. Nous avons donc utilisé des techniques expérimentales, qui permettent de discriminer clairement les étapes entre l'apoptose et la nécrose, pour étudier les effets de la CsA sur les CE d'origine artérielle. Aucune étude n'avait été faite avec autant de précision auparavant. Nos résultats permettent de réconcilier les deux parties de la controverse. Nous confirmons le rôle anti-apoptotique de la CsA sur les CEA et apportons des évidences que la mort cellulaire induite par la CsA sur les CEA est une forme de mort cellulaire non-apoptotique avec les caractéristiques morphologiques de la nécrose

sous contrôle moléculaire du stress oxydatif et de la protéine lysosomale cathepsine D. Ces résultats ouvrent la voie au développement de nouvelles stratégies, afin de limiter les effets néfastes de la CsA. L'utilisation de capteurs d'anions superoxydes ou d'inhibiteurs de l'activité de la cathepsine D pourraient contribuer à réduire les dommages causés par la CsA à l'endothélium artériel.

Cependant, des résultats non publiés (Raymond et Hébert) démontrent que la viabilité des cellules endothéliales veineuses n'est pas affectée de la même façon par la CsA. En effet, la CsA ne réduit pas la viabilité des cellules veineuses aux mêmes concentrations qui affectent les cellules artérielles. Nous savons que les biopsies de patient souffrant de complications, suite à la prise de CsA, démontrent une atteinte artérielle avec la formation de thrombus [450]. Il serait donc possible que les cellules endothéliales veineuses supportent mieux le stress oxydatif que les cellules artérielles. Les veines servent à retourner le sang vers les organes de filtration pour éliminer les déchets produits par l'organisme. Comme ces déchets sont toxiques, il est en effet normal que les cellules de l'endothélium veineux soient plus résistantes. Il serait donc approprié d'approfondir nos connaissances sur les effets de la CsA sur les cellules endothéliales veineuses. Nos résultats présents et ceux de cette recherche à effectuer permettront de déterminer des voies et des moyens d'inhiber l'activité néfaste de la CsA pour prévenir les dommages endothéliaux induits par la CsA.

Notre groupe a aussi découvert suite à l'étude d'une cohorte de patients receveurs de transplantations de reins ou rein-pancréas, que l'utilisation combinée de la CsA et du sirolimus, comme protocole d'immunosuppresseurs, est un facteur de

risque accru pour le développement de MT, alors que d'autres protocoles d'immunosuppression ne le sont pas [486]. En effet, l'utilisation du protocole de CsA et de sirolimus entraîne une diminution de l'apoptose, une augmentation de la nécrose et une inhibition de la prolifération endothéliale, ce qui contribue fortement à la déstabilisation des vaisseaux [486]. Ensemble, nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'apoptose endothéliale facilite le développement d'une autre forme de MCP de type nécrotique, qui serait plus néfaste et plus hasardeuse pour l'intégrité des vaisseaux. L'inhibition de l'apoptose endothéliale ne doit donc pas être une solution pour prévenir tout dommage, mais l'apoptose par opposition à la nécrose pourrait être un avantage et être impliquée dans les mécanismes de gestion des dommages vasculaires. Il est possible que l'apoptose endothéliale joue un rôle important dans la réparation et la limitation des dommages par un effet paracrin sur les cellules environnantes.

L'endothélium aurait donc pu développer des mécanismes afin de prévenir une mort cellulaire diffuse et favoriser la réparation. En fait, la majeure partie des recherches sur l'apoptose a été concentrée sur les mécanismes intracellulaires de régulation de l'apoptose [18, 19], mais peu de gens ont cherché à comprendre les effets de l'apoptose sur l'environnement local. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons tenté d'appliquer cette hypothèse au système vasculaire. Nous proposons que l'apoptose des CE est un élément important qui stimule la relâche de médiateurs solubles bioactifs qui initient la réparation vasculaire. Ces médiateurs vont pouvoir induire une activité anti-apoptotique autocrine favorable sur les CE de

manière à bloquer la généralisation de l'insulte endothéliale à l'ensemble de l'arbre vasculaire et favoriser la réparation en stimulant la réendothélisation.

Dans un premier temps, nous avons stimulé l'apoptose de CE par la carence en sérum et évalué s'il y avait relâche de médiateurs solubles pouvant bloquer l'apoptose de CE. Nous avons découvert que les CE apoptotiques relâchent des médiateurs solubles dans le milieu sans sérum conditionné par les CE en condition pro-apoptotique (SSC) favorisant la viabilité des CE. Le SSC possède une activité anti-apoptotique, pro-proliférative et pro-angiogénique sur les CE. Les médiateurs solubles contenus dans le milieu SSC permettraient de limiter l'atteinte endothéliale et de favoriser la réparation de l'endothélium.

Notre modèle d'étude présente beaucoup de similitudes avec le préconditionnement aux stress. En effet, le préconditionnement aux stress est un des moyens d'adaptation expérimentale le plus efficace pour protéger la vasculature contre plusieurs insultes [454, 455]. Cependant dans des contextes cliniques, l'utilisation du préconditionnement pour induire une résistance aux stress est soit irréalisable ou impossible, puisqu'une insulte des organes est rarement un événement planifié. Le préconditionnement aux stress a été caractérisé principalement au niveau cardiaque. Les répercussions paracrines du préconditionnement aux stress sur la régulation moléculaire de l'apoptose des CE et les mécanismes exacts de cytoprotection déployés chez les CE en association avec le préconditionnement sont encore largement non caractérisés. Il devient donc important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet anti-apoptotique des médiateurs

solubles relâchés par les CE en condition apoptotique, puisqu'ils pourront aider à comprendre à la fois les mécanismes impliqués dans le préconditionnement et les mécanismes de protection et réparation vasculaire.

Chez les CE exposés au milieu SSC, nous avons démontré que l'inhibition génétique de l'apoptose est indépendant de p53, mais passe par une diminution de la relâche cytosolique du cyt C, une augmentation de Bcl-2, une diminution de Bax et semble impliquer l'activation de la PKC. Des études précédentes avaient suggéré un rôle important de l'activation de la PKC dans la transduction du signal de cytoprotection chez des modèles animaux et des modèles cellulaires de préconditionnement [457, 466-468, 487]. En utilisant la staurosporine [488], un inhibiteur des PKC, on peut déterminer si les PKC sont impliquées dans la signalisation anti-apoptotique [489]. Cependant, la staurosporine peut aussi inhiber d'autres kinases (ex : kinase  $Ca^{++}$ /calmoduline, protéine kinase A et protéine kinase G), mais à des concentrations qui sont de 10 à 30 fois supérieures à la concentration nécessaire pour inhiber la PKC. Mais la staurosporine ne permet pas de discriminer l'isoforme de la PKC impliquée dans cette activité anti-apoptotique et il en existe au moins 10 isoformes différentes [457]. Plusieurs évidences suggèrent que la PKCε serait importante pour le préconditionnement [467, 469-472]. Une étude plus poussée sur l'implication des différentes isoformes de la PKC est donc nécessaire pour déterminer l'isoforme de la PKC responsable et pour développer le parallèle entre notre modèle et le préconditionnement. Aucune étude n'a étudié l'isoforme de la PKC activé au niveau endothélial par le préconditionnement chez l'humain, ce qui

augmente l'intérêt de cette caractérisation. La découverte d'un mécanisme d'induction du préconditionnement qui serait contrôlable ouvre des voies nouvelles. En effet, notre modèle d'étude semble indiquer une induction de voie de signalisation similaire à celles impliquées dans le préconditionnement pour médier son activité cytoprotectrice. La caractérisation plus poussée des facteurs d'induction permettrait de développer des composés permettant d'induire une résistance chez les patients à risque de dysfonctions endothéliales ou encore d'améliorer la transplantation en protégeant les organes, soit durant le transfert du donneur au receveur ou après l'implantation chez le receveur.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets du milieu SSC sur une autre composante de la paroi vasculaire, les CML. Les CML jouent un rôle important dans le contrôle de la vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux, mais aussi dans la réparation des vaisseaux suite à une insulte par la migration et la prolifération [187, 188, 237]. Cependant, la prolifération et la migration soutenues des CML sont responsables de complications vasculaires pathologiques dans les vaisseaux, comme un épaississement myo-intimal et un remodelage vasculaire pathologique [293]. Nous avons donc stimulé l'apoptose de CE, par carence en sérum et par l'exposition à la MMC, et évalué s'il y avait relâche de médiateurs solubles pouvant bloquer l'apoptose des CML. Nous avons découvert que les CE apoptotiques relâchent des médiateurs solubles dans le milieu SSC favorisant la viabilité des CML. Nous avons découvert que le milieu SSC possède une activité anti-apoptotique et pro-proliférative sur les CML. Nous avons évalué si l'apoptose des CE est un pré-requis pour la relâche de médiateurs solubles anti-apoptotiques. L'inhibition de l'apoptose des CE

lors de la génération du milieu SSC par le ZVAD-FMK, un inhibiteur pan-caspases, réduit l'activité anti-apoptotique du milieu SSC sur les CML. Ces résultats démontrent que la relâche des médiateurs solubles anti-apoptotiques survient après l'activation des caspases. Les médiateurs solubles contenus dans le milieu SSC permettraient de stimuler une activité anti-apoptotique et pro-proliférative paracrine sur les CML, ce qui entraînerait un remodelage vasculaire et un épaissement myo-intimal normal et nécessaire pour la cicatrisation et la réparation suite à une insulte. Cependant, une persistance de la relâche des médiateurs de réparation entraînerait un remodelage vasculaire et un épaissement myo-intimal continu, qui ne serait plus une réponse de réparation, mais entraînerait des complications pathologiques.

Des rapports récents suggèrent que, des gènes et des voies de signalisation qui favorisent la prolifération et la résistance à l'apoptose chez les CML sont impliquées dans l'épaississement myo-intimal *in vivo*. En effet, une augmentation de l'expression de Bcl-xL [350, 357-359], une diminution de l'expression de p53 [354, 360] et l'augmentation de l'expression et de l'activation de ERK 1/2 [361, 362] dans les cellules musculaires lisses jouent un rôle dans l'épaississement myo-intimal. Nos résultats suggèrent que cette boucle anti-apoptotique paracrine module précisément l'expression et l'activation de ces gènes et voies de signalisation décrites précédemment. Ainsi, les voies de signalisations et les patrons d'expressions de protéines et de gènes stimulés par cette boucle anti-apoptotique parallèles ceux des facteurs moléculaires de risques connus pour l'épaississement myo-intimal.



Ne connaissant pas la nature des médiateurs solubles anti-apoptotiques présents dans le milieu SSC, nous avons débuté la caractérisation biochimique. Suite à la concentration du milieu SSC et à son fractionnement sur des filtres de poids moléculaires, nous avons fractionné le milieu SSC et en utilisant une colonne d'attachement d'anions forts en chromatographie liquide à forte pression (FPLC). L'activité biologique des différentes fractions a été vérifiée sur les CML et seulement une fraction a démontré une activité anti-apoptotique significative. Un gel SDS-PAGE et une coloration à l'argent démontrent plusieurs bandes dans les fractions obtenues, dont deux bandes exclusivement présentes dans la fraction bioactive. Par la suite, en utilisant la spectrométrie de masse (SM), nous avons fait analyser la bande majeure présente dans la fraction bioactive pour en obtenir la séquence. Sur les 13 fragments de la digestion peptidiques analysés pour la bande majeure, 11 fragments correspondent au perlécan, un protéoglycan de la membrane basale [216-221].

En fait, les fragments se retrouvent tous dans le Domaine V du perlécan. Ils débutent à la partie C-terminale du perlécan et remontent en N-terminal. Nos résultats suggèrent qu'une enzyme protéolytique est activée durant l'apoptose des CE et serait responsable de la libération d'une forme tronqué du perlécan actif sur les CML. En accord avec nos résultats, le milieu sans sérum contenant des concentrations croissantes de perlécan natif n'augmente pas la viabilité des CML, alors que des composants/motifs présents sur le fragment du domaine V du perlécan inhibent l'apoptose des CML (voir plus bas). Le clivage d'une protéine pour libérer une forme active est un phénomène commun. Nous savons que la protéolyse de composant de la membrane basale, comme le collagène de type IV, XV et XVIII, permet la libération

de facteurs cryptiques bioactifs, comme la tumstatine, arrestine et endostatine, qui sont impliquées dans le contrôle de l'angiogénèse [197]. La maturation du TGF- $\beta$  passe aussi par le clivage d'une forme précurseur en protéine activée. Cette activation peut être effectuée par une acidification, une alkanisation, une protéase (ex. : plasmine ou cathepsine) ou par un changement conformationnel par la thrombospondine [490]. Un autre exemple est le système rénine-angiotensine, où l'angiotensinogène est sécrétée, clivée en en angiotensine I par la rénine et l'angiotensine I est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine en angiotensine II [491]. Cette double maturation de l'angiotensinogène en angiotensine II se produit normalement dans la circulation, mais des études récentes démontrent qu'il existe une production tissulaire locale ayant une activité indépendante de la circulation [492].

En analysant en détail le domaine V, on voit qu'il comprend quatre motifs d'homologie EGF dans sa séquence, trois motifs homologues au domaine G de la laminine-1 et une sérine servant d'ancrage à la sulfate de chondroïtine [175]. En se basant sur le poids de  $23 \pm 2$  kD retrouvé sur le gel SDS-PAGE de la fraction biologiquement active et sur la localisation des fragments peptidiques de SM, nous avons déduit en utilisant le serveur internet de biologie moléculaire ExpASy que le fragment isolé du milieu SSC, qui débute en C-terminal du perlécan, contient un motif d'homologie EGF, un motif homologue au domaine G de la laminine-1 et la sérine servant d'ancrage de la sulfate de chondroïtine. Nous avons fait synthétiser un peptide de 36 A.A. qui comprend le motif EGF et la sérine d'ancrage de la sulfate de

chondroïtine qui se retrouve dans le fragment estimé. Nous avons vérifié l'activité anti-apoptotique du peptide synthétique et à la sulfate de chondroïtine sur les CML, afin de déterminer s'ils reproduisent l'activité anti-apoptotique conférée par le SSC.

Nous avons poursuivi en étudiant l'effet de l'exposition des CML à la sulfate de chondroïtine et au peptide synthétique sur l'inhibition de l'apoptose induite par la carence en sérum. Nous avons découvert que l'exposition à la sulfate de chondroïtine et au peptide synthétique permette de réduire significativement l'apoptose chez les CML. La sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique exercent un effet anti-apoptotique significatif sur les CML, mais pas aussi fort que l'effet du milieu SSC. Sachant que la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique ont une activité anti-apoptotique sur les CML, il devient intéressant de savoir si les mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité anti-apoptotique sont les mêmes que pour le milieu SSC. La sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique peuvent induire une phosphorylation de ERK 1/2 et augmenter le niveau de Bcl-xL comme le fait le milieu SSC. Cependant, la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique ne peuvent diminuer le niveau de la protéine p53 chez les CML. Nos résultats suggèrent que la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique induisent les mêmes mécanismes moléculaires que le milieu SSC pour médier leur activité anti-apoptotique. Cependant, à la différence du milieu SSC qui peut empêcher une induction de p53, la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique n'ont pas d'effet sur le niveau de p53, ce qui pourrait expliquer l'absence d'activité pro-proliférative de la part de la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique.

Nous savons que le milieu SSC possède une activité anti-apoptotique et pro-proliférative à la fois sur les CE et sur les CML. Il est donc possible que le domaine V du perlécan soit responsable de l'activité anti-apoptotique sur les CE, comme sur les CML. En effet, des expériences effectuées dans le laboratoire du Dr Hébert (données non publiées, Désormeaux, Raymond et Hébert) démontrent que la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique du domaine V du perlécan possèdent une activité anti-apoptotique sur les CE. Nous ne savons cependant pas si la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique sont responsables de l'activité pro-proliférative sur les CE. Nous avons aussi découvert que la sulfate de chondroïtine peut induire une activité pro-angiogénique sur les CE et que le peptide synthétique semble posséder la même activité (données non publiées, Raymond et Hébert). Il semble donc qu'un facteur présent dans le milieu SSC, le domaine V du perlécan, soit responsable de l'activité anti-apoptotique à la fois sur les CE et sur les CML. La caractérisation des mécanismes moléculaires activés par la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique du domaine V du perlécan reste à faire. Nous sommes présentement à déterminer si la sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique stimulent les mêmes mécanismes que le milieu SSC chez les CE.

Il sera aussi très important d'effectuer aussi le clonage de la partie C-terminal du perlécan pour en comprendre l'activité. La structure peptidique du fragment complet du perlécan avec la sulfate de chondroïtine attachée pourrait démontrer des activités différentes ou plus accentuées que seulement le peptide synthétique ou la sulfate de chondroïtine seule, puisque la combinaison des deux molécules séparées ne démontre pas une augmentation d'activité. Le clonage de cette partie du domaine V

permettra aussi la production d'anticorps, qui pourront aider à identifier les protéines membranaires qui sont impliquées dans la signalisation de l'activité anti-apoptotique. Une étude préliminaire a permis d'exclure le récepteur au EGF comme protéine d'interaction (données non publiées, Raymond et Hébert). Cependant, des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, comme les sélectines, pourraient être importantes. En effet, les sélectines comportent un motifs EGF dans leurs structures [493, 494] et elles ont été démontrées comme pouvant interagir avec des protéoglycans et la sulfate de chondroïtine [495-498].

Dans la partie C-terminal du domaine V du perlécan, on retrouve aussi une séquence homologue au domaine G de la laminine-1. Nous savons que la laminine peut interagir avec les intégrines [499]. Les intégrines sont des récepteurs de surfaces cellulaires et qui s'attachent à des composantes de la matrice extracellulaire [499]. Elles ont été démontrées comme pouvant prévenir l'apoptose induite par la perte d'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire par une modulation de la protéine pro-apoptotique Bim [500]. Nous n'avons pas encore étudié si une activité anti-apoptotique pouvait être conféré par cette séquence homologue domaine G de la laminine-1, mais le clonage de la partie C-terminale du perlécan et son expression vont nous permettre de faire cette analyse. Le clonage de la partie C-terminale du perlécan sur une plus grande longueur pourra aussi contribuer à la recherche sur la protéase impliquée dans le clivage du perlécan.

Nous avons aussi vérifié si l'ajout de la sulfate de chondroïtine ou du peptide synthétique à du milieu sans sérum permet d'augmenter la prolifération des cellules

musculaires lisses comme le fait le milieu SSC. Ni la sulfate de chondroïtine, ni le peptide synthétique n'ont un effet sur la prolifération des CML. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs doivent être présents dans le milieu SSC. Dans le laboratoire, nous avons revérifié l'activité biologique des différentes fractions obtenues par FPLC, mais pour leurs effets pro-prolifératives. Sur les CML, des fractions différentes de la fraction 16 ont démontré une activité significative. En reprenant le gel SDS-PAGE, nous avons pu observer d'autres bandes mineures dans les différentes fractions avec une activité pro-proliférative. Ces bandes ont été séquencées. Les peptides candidats sont actuellement testés pour leur activité pro-proliférative sur les CML (données non publiées, Désormeaux et Hébert). Il est intéressant de remarquer que les candidats responsables de la prolifération et de la résistance à l'apoptose ne sont pas les mêmes.

Notre technique de caractérisation biochimique était grossière, mais efficace. En effet, il est fort possible que d'autres facteurs, que le fragment de perlécan, soient présent dans le milieu SSC, mais les étapes précédant le fractionnement du milieu SSC étaient dénaturantes. Le milieu SSC a du être lyophilisé pour pouvoir être fractionné par FPLC, ce qui peut entraîner une dénaturation des facteurs présents. Finalement, l'élution des fractions sur la colonne de FPLC a été effectuée avec un gradient de sels. Les essais d'activité sur les CML ont été effectués en diluant les fractions qui contenaient une quantité croissante de sel. À forte concentration, le sel a pu faire interférence avec les facteurs possiblement présents dans les fractions et empêcher la détection d'une activité. Une dialyse des fractions aurait été possible pour éliminer le sel présent, mais ne connaissant pas la taille des facteurs recherchés,

nous ne voulions pas perdre des petits facteurs lors de la dialyse. Donc, les conditions dénaturantes de la concentration par lyophilisation et les manipulations effectuées pour le fractionnement ont pu faire en sorte de ne pas nous permettre de détecter d'autres facteurs plus fragiles. Il est donc important de continuer la caractérisation biochimique du milieu SSC, mais avec une technique moins dénaturante et plus sensible. Afin de caractériser les autres facteurs qui doivent être présents dans le milieu SSC, il serait possible d'utiliser une approche sur gel 2-D [501]. Il serait ainsi possible de comparer le patron des facteurs relâchés entre des CE apoptotiques et non-apoptotiques, puisque nous savons que l'inhibition de l'apoptose des CE inhibe la relâche des facteurs anti-apoptotiques. Nous travaillons présentement sur ce projet de caractérisation en gel 2-D dans le laboratoire (données non publiées, Désormeaux et Hébert).

Nous savons aussi que les CML présentent une plasticité accrue et des évidences de dédifférentiation au niveau des sites d'insultes [237]. Cet état synthétique des CML permet leur prolifération et migration, ce qui contribue au développement des lésions myo-intimales qui caractérisent l'athérosclérose [237]. Des expériences préliminaires dans le laboratoire démontrent que le milieu SSC peut induire la migration des CML *in vitro* (données non publiées, Vigneault et Hébert). Nous avons aussi découvert par une analyse à l'aide de micro-puces à ADN, que l'expression de la chaîne lourde de la myosine, une protéine du cytosquelette, est diminuée dans les CML exposées au milieu SSC (données non publiées, Raymond et Hébert). Il est aussi intéressant de remarquer que les intégrines peuvent justement influencer la réorganisation du cytosquelette [499]. Il est donc possible que le motif

homologue domaine G de la laminine-1 sur la partie C-terminale du domaine V puisse influencer la migration des CML. Le clonage et l'expression de différentes sections de la partie C-terminale du domaine V du perlécan permettra d'élucider cette activité.

Nous savons que plusieurs études suggèrent que les CML qui contribuent à la formation des plaques athérosclérotiques sont d'origine clonale [292, 294-298]. La formation de plaques monoclonales dans les lésions athérosclérotiques suggérait à l'origine que la maladie nécessitait la transformation non maligne des CML, mais la formation des plaques monoclonales a maintenant été démontrée comme étant le résultat du développement normal de la paroi [292, 300]. De plus, des données *in vitro* démontrent qu'une stimulation induite par une insulte de sous-population de CML avec un potentiel prolifératif augmenté pourrait contribuer à l'épaississement de la paroi vasculaire [299]. Nos résultats permettent de formuler une hypothèse sur le développement des plaques monoclonales de CML. En effet, le milieu SSC induit une diminution de p53 dans les CML, or nous savons qu'une inhibition de p53 est associée avec une expansion clonale des tumeurs [89]. Il est donc possible que les médiateur(s) soluble(s) relâchés par les CE apoptotiques favorisent l'expansion clonale des CML dans l'environnement local par une inhibition continue de p53.

Nos résultats suggèrent que les caspases présentent dans les cellules endothéliales apoptotiques activent une protéase inconnue (X). En fait, l'activité anti-apoptotique paracrine ne se développe pas dans le milieu des cellules endothéliales si l'apoptose de celles-ci est inhibée par un inhibiteur pan-caspases (ZVAD-FMK) et la



séquence en acide aminé du perlécan ne révèle aucun site de clivage des caspases. L'activation des caspases ne serait donc pas impliquée directement dans la protéolyse du domaine V du perlécan. Nos résultats suggèrent donc l'implication d'une protéase X qui serait activée après les caspases et qui serait responsable de la protéolyse du perlécan. La protéolyse de composant de la membrane basale, comme le collagène de type IV, XV et XVIII, et la libération de facteurs cryptiques bioactifs, comme la tumstatine, arrestine et endostatine, a été impliquée dans le contrôle de l'angiogénèse [197].

Nos résultats suggèrent le développement d'un phénomène similaire durant l'apoptose des cellules endothéliales, soit la protéolyse de protéoglycans et la libération d'un facteur cryptique anti-apoptotique actif sur les CML. Nous travaillons présentement dans le laboratoire à la caractérisation de la protéase impliquée dans la génération du fragment du domaine V du perlécan. Nous avons découvert une protéase candidate, qui était retrouvée dans une bande mineure sur le gel SDS-PAGE obtenu suite au fractionnement du milieu SSC au FPLC. Cette protéase permet la digestion du perlécan et l'obtention d'un fragment d'environ 23 kD, qui correspondrait au niveau du poids moléculaire au fragment du domaine V du perlécan retrouvé dans le milieu SSC (données non publiées, Vigneault et Hébert).

Nos travaux nous ont amenés à faire la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité anti-apoptotique du milieu SSC sur les CE et les CML. L'activité anti-apoptotique passe par des voies de signalisation différentes dans les deux types cellulaires, ce qui nous offre la possibilité de développer des

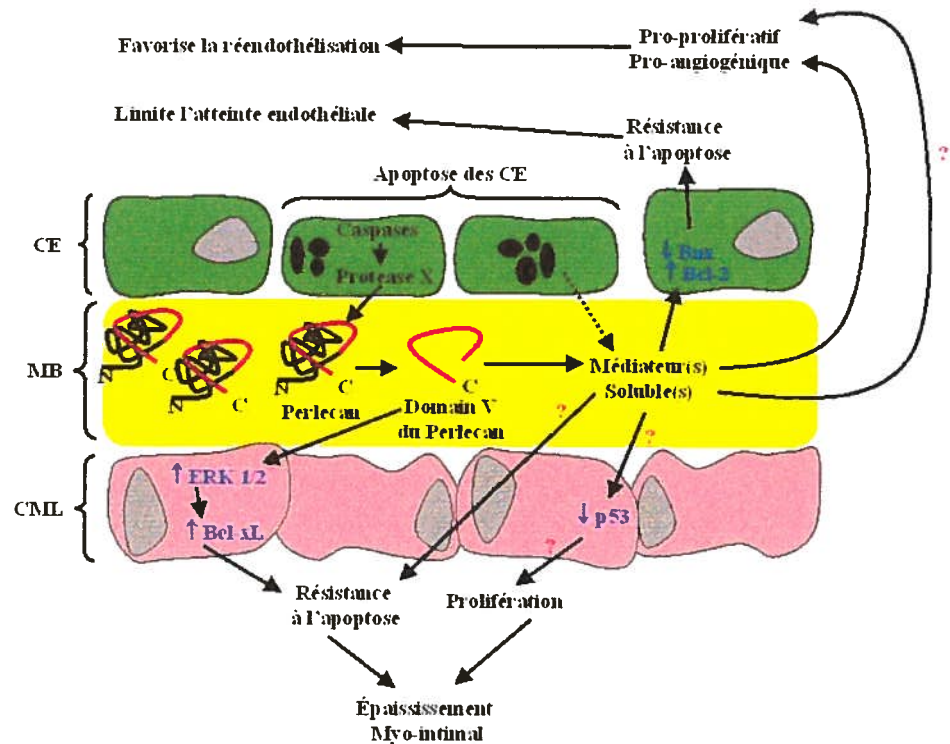
outils très ciblés pour activer ou bloquer l'apoptose des CE ou des CML. Cependant, nous ne savons que peu de chose sur les mécanismes impliqués dans l'activité pro-proliférative du milieu SSC sur les CE et les CML. Nous travaillons actuellement, dans le laboratoire, à mieux comprendre les mécanismes pro-prolifératifs et ainsi favoriser le développement de nouvelles cibles pharmacologiques sur les CE, pour favoriser la réendothélisation, et sur les CML, pour aider à contrôler l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire pathologique. La compréhension de l'activité pro-angiogénique du milieu SSC sur les CE est aussi très importante. Elle pourrait fournir des indices pour mettre au point des outils qui favoriseraient le développement de nouveaux vaisseaux suite à une insulte et pour inhiber la formation de vaisseaux dans des cas de développement tumoral. Finalement, il est important de continuer la caractérisation biochimique d'une manière plus approfondie sur gel 2-D pour découvrir les autres facteurs présents dans le milieu SSC. Ces facteurs pourraient être responsable d'une activité complémentaire anti-apoptotique sur les CE et les CML et pro-angiogénique sur les CE. Ces nouveaux facteurs pourraient aussi être responsables de l'activité pro-proliférative sur les CE et les CML.

En résumé, l'apoptose est généralement reconnue comme un processus propre et silencieux qui n'affecte pas l'homéostasie des cellules environnantes. Cependant suite à nos présentes découvertes, nous proposons de revoir ce concept. Nos résultats suggèrent donc que l'apoptose des CE induit la relâche de médiateurs solubles anti-apoptotiques actifs dans un premier temps sur les CE, mais aussi dans un deuxième temps sur les CML. Ces facteurs peuvent agir dans un premier temps de façon autocrine sur les CE pour induire des activités anti-apoptotiques, pro-prolifératives et

pro-angiogéniques. Ces boucles autocrines pourraient participer à contenir la réaction apoptotique endothéliale et éviter une dénudation généralisée de l'endothélium. De par ses activités angiogéniques et pro-prolifératives, ces boucles pourraient favoriser la guérison et la réendothélialisation. Les facteurs peuvent aussi agir dans un deuxième temps de façon paracrine sur les CML pour induire une activité anti-apoptotique et pro-proliférative. Il semble donc que le processus de MCP apoptotique a été conservé durant l'évolution des organismes, non seulement pour son rôle dans le développement et le maintien des organismes, mais aussi afin de favoriser la réparation suite à une insulte. L'apoptose serait donc un moyen propre pour retirer des cellules inutiles (embryogenèse ou maturation cellulaire) ou mortes (cas d'insultes ou d'infections) et un stimulus de la réparation aux environs de la lésion.

Donc, la relâche de facteurs solubles par les CE apoptotiques semble impliquer une protéase (X) qui serait activée en aval des caspases. Cette protéase X activée va ensuite pouvoir cliver le perlécan qui se retrouve en majeure partie dans l'intima ou membrane basale pour en libérer le domaine V. Le domaine V va pouvoir agir sur les CE pour favoriser la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse et sur les CML en favorisant la résistance à l'apoptose. Chez les CML, le domaine V stimule la phosphorylation de ERK 1/2, qui va ensuite agir en augmentant le niveau de Bcl-xL. Bcl-xL entraîne une résistance à l'apoptose chez les CML et favorise l'initiation de l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire. Comme le peptide synthétique du domaine V du perlécan et la sulfate de chondroïtine ne sont pas responsables de l'activité pro-proliférative chez les CE et les CML, il semble que d'autres facteurs présents dans le milieu SSC puissent induire ces effets. Chez les

CML, le milieu SSC induit une diminution de p53, ce qui entraîne une activité pro-proliférative. L'activation de cette boucle pro-proliférative représente un facteur d'initiation important pour favoriser le remodelage vasculaire et l'épaississement myo-intimal.



**Figure 1. Schéma de l'effet de l'apoptose endothéliale sur l'environnement vasculaire**

L'apoptose des CE induit la relâche de médiateur(s) soluble(s) actifs sur les CE et sur les CML. La relâche de facteurs solubles par les CE apoptotiques semble impliquer une protéase (X) qui serait activée après les caspases. Cette protéase X activée va ensuite cliver le perlécan qui se retrouve en majeure partie dans l'intima ou membrane basale pour en libérer le domaine V. Le domaine V va pouvoir agir sur les CE pour favoriser la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse et sur les CML en favorisant la résistance à l'apoptose. Chez les CE, le milieu SSC induit la résistance à l'apoptose par une induction de Bcl-2 et une diminution de Bax. Chez les CML, le

domaine V stimule la phosphorylation de ERK 1/2, qui va ensuite agir en augmentant le niveau de Bcl-xL. Bcl-xL entraîne une résistance à l'apoptose chez les CML et favorise l'initiation de l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire. Comme le peptide synthétique du domaine V du perlécan et la sulfate de chondroïtine ne sont pas responsables de l'activité pro-proliférative chez les CE et les CML, il semble que d'autres facteurs présents dans le milieu SSC puissent induire ces effets. Chez les CML, le milieu SSC induit une diminution de p53, ce qui entraîne une activité pro-proliférative. L'activation de cette boucle pro-proliférative représente un facteur d'initiation important pour favoriser le remodelage vasculaire et l'épaississement myo-intimal.

## **5 CONCLUSION**

Nos résultats nous permettent de clarifier le débat en cours sur le rôle de la CsA dans l'apoptose endothéliale. Nous confirmons ainsi le rôle anti-apoptotique de la CsA sur les CEA et apportons des évidences que la mort cellulaire induite par la CsA sur les CEA est une forme de mort cellulaire non-apoptotique avec les caractéristiques morphologiques de la nécrose sous contrôle moléculaire du stress oxydatif et de la protéine lysosomale cathepsine D. Nous avons aussi découvert que la stimulation de l'apoptose des CE permet la relâche des facteurs solubles ayant une activité anti-apoptotique, pro-proliférative sur les CE et CML et une activité pro-angiogénique sur les CE. L'activité anti-apoptotique autocrine sur les CE et paracrine sur les CML passent par des mécanismes moléculaires différents. L'activité anti-apoptotique autocrine est p53-indépendante, elle est associée à une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une diminution de Bax, ainsi qu'une inhibition de la relâche du cytochrome C de la mitochondrie. L'activité anti-apoptotique semble impliquée la voie de la PKC dans les CE menant à la résistance à l'apoptose. Par contre l'activité anti-apoptotique paracrine sur les CML est associée à une activation de la voie ERK 1/2 qui stimule l'augmentation de l'expression de Bcl-xL. L'activité anti-apoptotique n'est pas médiée par une molécule connue pour son activité anti-apoptotique sur les CE ou les CML, mais nous avons découvert que la stimulation de l'apoptose des CE permet la relâche d'un fragment d'un protéoglycan, une partie du domaine V du perlécan. Le fragment du domaine V du perlécan n'était pas connu comme ayant une activité anti-apoptotique sur les CE et les CML. Un peptide synthétique d'une partie du fragment du domaine V du perlécan et la sulfate de chondroïtine, qui possède un



site d'ancrage sur se fragment, possèdent eux aussi une activité anti-apoptotique sur les CE et les CML semblable à l'activité du milieu SSC.

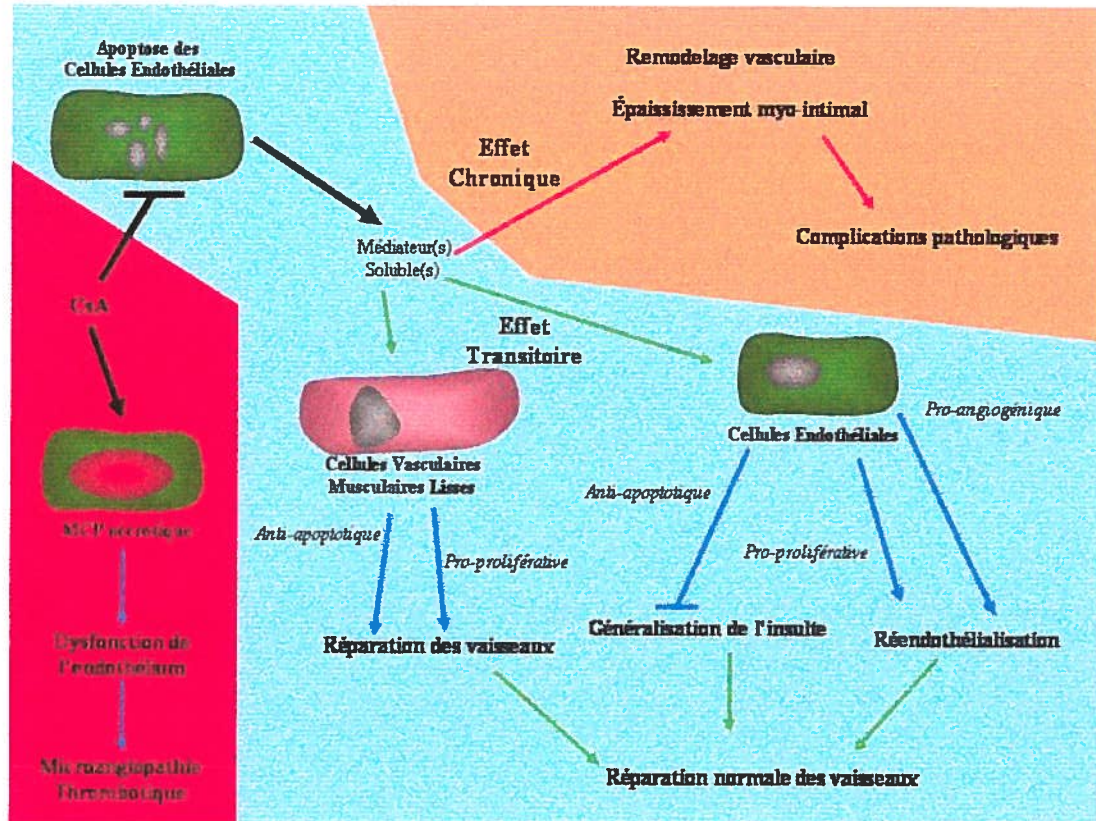
Nos travaux démontrent que l'inhibition de l'apoptose endothéliale ne semble pas une solution pour empêcher l'initiation de l'épaississement myo-intimal et du remodelage vasculaire, puisque l'inhibition de l'apoptose, par deux inhibiteurs (la CsA et l'acide bonkréique), peut entraîner le développement d'une autre forme de MCP. La MCP nécrotique engendrée par l'inhibition de l'apoptose endothéliale par la CsA pourrait favoriser le développement d'une réaction pro-inflammatoire qui serait responsable de complications vasculaires. Ces résultats ouvrent la voie au développement de nouvelles stratégies pour limiter les effets néfastes de la CsA. Il semble donc que le développement de la MCP apoptotique des CE aurait un avantage par rapport au développement de la MCP nécrotique. La nécrose serait plus dommageable que l'apoptose au niveau vasculaire. En effet, nos travaux démontrent aussi que l'apoptose n'est donc probablement pas seulement régulée au niveau moléculaire intracellulaire, mais elle régule au niveau moléculaire la réparation des cellules avoisinantes présentes dans l'environnement local. Nos travaux, présentés ici, suggèrent ce mode de régulation de l'environnement local par l'apoptose des cellules endothéliales. L'apoptose endothéliale est impliquée par différentes études comme étant importante dans l'initiation de l'épaississement myo-intimal et du remodelage vasculaire.

L'apoptose endothéliale entraîne le relâchement de facteurs solubles. Dans un premier temps, les facteurs solubles joueraient un rôle protecteur au niveau de

l'endothélium par une activité anti-apoptotique. Ces facteurs solubles permettraient de bloquer l'apoptose des cellules endothéliales environnantes. L'inhibition de l'apoptose préviendrait une atteinte généralisée de l'endothélium. Dans un deuxième temps, les facteurs solubles permettraient de stimuler la réparation des vaisseaux. L'induction de la prolifération et de l'angiogénèse chez les CE par les facteurs solubles favoriseraient la réendothélisation suite à une insulte. Aussi, l'inhibition de l'apoptose et l'induction de la prolifération chez les CML par les facteurs solubles permettraient de favoriser la réparation des vaisseaux suite à une insulte par un épaississement myo-intimal et un remodelage vasculaire. Les effets sur les CE et les CML sont très importants dans un contexte de réparation des vaisseaux.

Il semble donc évident que l'organisme a développé des mécanismes adaptatifs, afin de se protéger contre une insulte. Ces mécanismes adaptatifs peuvent éliminer par apoptose les cellules inutiles ou dangereuses sans induire une réponse inflammatoire qui endommagerait les tissus environnants. En même temps, l'organisme a su adapter ce système d'élimination de cellules (apoptose) pour qu'il initie immédiatement la réparation de l'insulte par la libération de facteurs paracrins. Ces facteurs paracrins vont stimuler les cellules de l'environnement local pour répondre à l'insulte et favoriser la réparation. Cependant, les effets sur les CE et les CML doivent être transitoires dans l'organisme de manière à favoriser la cicatrisation des vaisseaux. Mais une dérégulation de l'apoptose endothéliale, qui entraîne la relâche continue de facteurs solubles et une exposition chronique à ces facteurs de réparation, pourrait favoriser l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire pathologique.

L'apoptose endothéliale est donc importante au niveau vasculaire pour son homéostasie. L'inhibition de l'apoptose des CE n'est pas souhaitable puisqu'elle entraîne le développement d'une forme de MCP semblable à la nécrose, qui pourrait induire de l'inflammation et inhiber la relâche des facteurs de réparations. La compréhension des mécanismes impliqués dans la relâche des facteurs solubles de réparation, la caractérisation de ces facteurs et les mécanismes d'action des facteurs sur les constituants de la paroi vasculaire sont très importants. Ils vont nous permettre de développer de nouvelles stratégies et une toute nouvelle génération de composés très ciblés pour favoriser la réparation des vaisseaux et inhiber le remodelage vasculaire pathologique.



**Figure 1. Schéma de la réparation des vaisseaux : l'épaississement myo-intimal et le remodelage vasculaire.**

L'apoptose endothéliale entraînerait le relâchement de médiateur(s) soluble(s). Ce(s) médiateur(s) jouerait un rôle sur les CE en limitant la généralisation de l'insulte au niveau de l'endothélium (anti-apoptotique) et en favorisant la réendothélialisation suite à l'insulte (pro-prolifératif et pro-angiogénique) pour réparer le vaisseau. L'inhibition de l'apoptose et l'induction de la prolifération chez les CML par le(s) médiateur(s) soluble(s) permettraient de favoriser la réparation des vaisseaux après une insulte. Cependant, tous ces effets sont normalement transitoires dans l'organisme de manière à favoriser la réparation et la cicatrisation normales des vaisseaux. Cependant, une

exposition prolongée ou chronique à ce(s) médiateur(s) de réparation, suite à une dérégulation de l'apoptose endothéliale, entraînerait alors l'épaississement myointimal et le remodelage vasculaire, entraînant des complications pathologiques. De plus, l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales par la CsA peut rediriger la mort cellulaire vers une forme de MCP nécrotique, potentiellement plus néfaste pour l'homéostasie vasculaire. En effet, la MCP nécrotique pourrait favoriser la dysfonction de l'endothélium par le développement d'une réaction pro-inflammatoire. Cet effet de la CsA sur l'inhibition de l'apoptose endothéliale pourrait expliquer le risque accru de MT chez l'humain en association avec la CsA.

## **6 RÉFÉRENCES**

1. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-54.
2. Kerr, J., A. Wyllie, and A. Currie, *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
3. Thompson, C., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**: p. 1456-1462.
4. Higaki, K., H. Yano, and M. Kojiro, *Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues*. Am J Pathol, 1996. **149**(2): p. 429-37.
5. Kaufmann, S.H. and G.J. Gores, *Apoptosis in cancer: cause and cure*. Bioessays, 2000. **22**(11): p. 1007-17.
6. Lynch, D.H., et al., *FasL/Fas and TNF/TNFR interactions in the regulation of immune responses and disease*. Behring Inst Mitt, 1996. **97**: p. 175-84.
7. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Cell, 1995. **81**(6): p. 935-46.
8. Reap, E.A., et al., *Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 936-43.
9. Rieux-Laucat, F., et al., *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1347-9.

10. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. *Annu Rev Physiol*, 1998. **60**: p. 619-42.
11. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. *Anat Histol Embryol*, 2002. **31**(4): p. 214-23.
12. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 3-15.
13. Mehendale, H.M., et al., *Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity*. *Faseb J*, 1994. **8**(15): p. 1285-95.
14. Wyllie, A., J. Kerr, and A. Currie, *Cell death: The significance of apoptosis*. *Int Rev of Cytol*, 1980. **68**: p. 251-306.
15. Weedon, D., J. Searle, and J.F. Kerr, *Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology*. *Am J Dermatopathol*, 1979. **1**(2): p. 133-44.
16. Leist, M. and M. Jäätelä, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**: p. 1-10.
17. Désormeaux, A., M. Raymond, and M. Hébert, *Programmed cell death in endothelial cells : Implications in regulation of vascular injury*. *Recent Res. Devel. Human Pathol.*, 2003. **1**: p. 1-8.
18. Savill, J. and F. V, *Corpses clearance defines the meaning of cell death*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 784-788.
19. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**: p. 770-776.



20. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
21. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**: p. 1415-20.
22. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V*. J Imm Met, 1995. **184**: p. 39-51.
23. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
24. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
25. Cikala, M., et al., *Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra*. Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 959-62.
26. Budihardjo, I., et al., *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 269-90.
27. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
28. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 12-8.

29. Liu, X., et al., *DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis*. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 175-84.
30. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
31. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
32. Wyllie, A., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. *Nature*, 1980. **284**: p. 555-556.
33. Rudel, T. and G. Bokoch, *Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2*. *Science*, 1997. **276**: p. 1571-4.
34. Buendia, B., A. Santa-Maria, and J.C. Courvalin, *Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex protein during apoptosis*. *J Cell Sci*, 1999. **112**(Pt11): p. 1743-1753.
35. Rao, L., D. Perez, and E. White, *Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6Pt1): p. 1441-1455.
36. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. *Science*, 1997. **278**: p. 294.
37. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(11): p. 1028-42.

38. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
39. Stennicke, H.R., et al., *Caspase-9 can be activated without proteolytic processing*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8359-62.
40. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
41. Cain, K., et al., *Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22686-92.
42. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
43. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
44. Holcik, M., H. Gibson, and R.G. Korneluk, *XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target*. Apoptosis, 2001. **6**(4): p. 253-61.
45. Liston, P., et al., *Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 349-53.
46. Uren, A.G., et al., *Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4974-8.

47. Duckett, C.S., et al., *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. *Embo J*, 1996. **15**(11): p. 2685-94.
48. Endrizzi, M.G., et al., *Genomic sequence analysis of the mouse Naip gene array*. *Genome Res*, 2000. **10**(8): p. 1095-102.
49. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4292-301.
50. Rothe, M., et al., *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins*. *Cell*, 1995. **83**(7): p. 1243-52.
51. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. *Nat Med*, 1997. **3**(8): p. 917-21.
52. Miller, L.K., *An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(8): p. 323-8.
53. Hinds, M.G., et al., *Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat*. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(7): p. 648-51.
54. Sun, C., et al., *NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP*. *Nature*, 1999. **401**(6755): p. 818-22.
55. Uren, A.G., E.J. Coulson, and D.L. Vaux, *Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts*. *Trends Biochem Sci*, 1998. **23**(5): p. 159-62.
56. Joazeiro, C.A. and A.M. Weissman, *RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity*. *Cell*, 2000. **102**(5): p. 549-52.

57. Duckett, C.S., et al., *Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 608-15.
58. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
59. Chu, Z.L., et al., *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10057-62.
60. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
61. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP protein*. Cell, 2000. **102**: p. 43.
62. Suzuki, Y., et al., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.
63. Martins, L.M., et al., *The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 439-44.
64. Verhagen, A.M., et al., *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 445-54.

65. van Loo, G., et al., *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity.* Cell Death Differ, 2002. 9(1): p. 20-6.
66. Hegde, R., et al., *Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction.* J Biol Chem, 2002. 277(1): p. 432-8.
67. Liston, P., et al., *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.* Nat Cell Biol, 2001. 3(2): p. 128-33.
68. Perrelet, D., et al., *Motoneuron resistance to apoptotic cell death in vivo correlates with the ratio between X-linked inhibitor of apoptosis proteins (XIAPs) and its inhibitor, XIAP-associated factor 1.* J Neurosci, 2004. 24(15): p. 3777-85.
69. Li, W., et al., *Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi.* Nat Struct Biol, 2002. 9(6): p. 436-41.
70. Tsujimoto, Y., et al., *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.* Science, 1985. 228(4706): p. 1440-3.
71. Bakhshi, A., et al., *Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18.* Cell, 1985. 41(3): p. 899-906.
72. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.* Nature, 1990. 348(6299): p. 334-6.

73. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. *Nature*, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
74. Antonsson, B. and J.C. Martinou, *The Bcl-2 protein family*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 50-57.
75. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. *Science*, 1998. **281**(5391): p. 1322-1326.
76. Reed, J.C., *Double identity for proteins of the Bcl-2 family*. *Nature*, 1997. **387**(6635): p. 773-776.
77. McDonnell, J.M., et al., *Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists*. *Cell*, 1999. **96**(5): p. 625-34.
78. Chou, J.J., et al., *Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling*. *Cell*, 1999. **96**(5): p. 615-24.
79. Paquet, C. and R. Bertrand, *Unique and multi-domain Bcl-2 family members: Post-translational modifications and apoptosis regulation*, in *Recent Res. Devel. Biophys. Biochem.*, R. Signpost, Editor. 2003: Kerala. p. 291-325.
80. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
81. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 777-83.
82. Ferri, K.F. and G. Kroemer, *Organelle-specific initiation of cell death pathways*. *Nature Cell Biology*, 2001. **3**(11): p. E255-E263.

83. Nakano, G. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. 7(3): p. 683-694.
84. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-310.
85. Yu, J., et al., *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. Mol Cell, 2001. 7(3): p. 673-82.
86. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. 288(5468): p. 1053-8.
87. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. Science, 2004. 303(5660): p. 1010-4.
88. Ko, L.J. and C. Prives, *p53: puzzle and paradigm*. Genes Dev, 1996. 10(9): p. 1054-72.
89. Prives, C. and P. Hall, *The p53 pathway*. J Pathol, 1999. 187(1): p. 112-126.
90. Newmeyer, D.D. and S. Ferguson-Miller, *Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death*. Cell, 2003. 112(4): p. 481-90.
91. Wallace, D.C., *Diseases of the mitochondrial DNA*. Annu Rev Biochem, 1992. 61: p. 1175-212.
92. Wallace, D.C., *Mitochondrial genes and disease*. Hosp Pract (Off Ed), 1986. 21(10): p. 77-87, 90-2.
93. Wallace, D.C., *Maternal genes: mitochondrial diseases*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1987. 23(3): p. 137-90.
94. Shoffner, J.M.t. and D.C. Wallace, *Oxidative phosphorylation diseases. Disorders of two genomes*. Adv Hum Genet, 1990. 19: p. 267-330.



95. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. J Neurochem, 2002. **80**(5): p. 780-7.
96. Staniek, K., et al., *Mitochondrial superoxide radical formation is controlled by electron bifurcation to the high and low potential pathways*. Free Radic Res, 2002. **36**(4): p. 381-7.
97. Leist, M., et al., *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-1486.
98. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
99. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
100. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 19-30.
101. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-446.
102. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes and Dev, 2001. **15**: p. 2922-2933.
103. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**: p. 1309-1312.
104. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 1835-40.

105. Bossy-Wetzell, E., D.D. Newmeyer, and D.R. Green, *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization*. *Embo J*, 1998. **17**(1): p. 37-49.
106. Goldstein, J.C., et al., *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(3): p. 156-62.
107. Waterhouse, N.J., et al., *Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(2): p. 319-28.
108. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
109. Muchmore, S.W., et al., *X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death*. *Nature*, 1996. **381**(6580): p. 335-41.
110. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. *Nature*, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
111. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Bcl-2 family: life-or-death switch*. *FEBS Lett*, 2000. **466**(1): p. 6-10.
112. Loeffler, M. and G. Kroemer, *The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 19-26.
113. Sun, C., et al., *NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP*. *Nature*, 1999. **401**(6755): p. 818-822.

114. Riedl, S.J., et al., *Structural basis for the inhibition of caspase by XIAP*. Cell, 2001. **104**(5): p. 791-800.
115. Huang, Y., et al., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell, 2001. **104**: p. 781-790.
116. Chai, J., et al., *Structural basis of caspase-7 inhibition of XIAP*. Cell, 2001. **104**(5): p. 769-780.
117. Jaattela, M. and J. Tschopp, *Caspase-independent cell death in T lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 416-23.
118. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** ( Pt 1): p. 1-16.
119. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-795.
120. Gross, A., et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1156-1163.
121. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
122. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-490.
123. Chautan, M., et al., *Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway*. Curr Biol, 1999. **9**: p. 967-970.
124. Banki, K., et al., *Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently*

- from activation of caspases in Fas signaling.* J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1466-79.
125. Hockenbery, D.M., et al., *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.* Cell, 1993. **75**(2): p. 241-51.
126. Johnson, T.M., et al., *Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11848-52.
127. Korsmeyer, S.J., *Regulators of cell death.* Trends Genet, 1995. **11**(3): p. 101-5.
128. Um, H.D., J.M. Orenstein, and S.M. Wahl, *Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway.* J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3469-77.
129. Williams, M.S. and P.A. Henkart, *Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas.* J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2395-402.
130. Zamzami, N., et al., *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death.* J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 367-77.
131. Esteve, J.M., et al., *Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro.* Faseb J, 1999. **13**(9): p. 1055-64.
132. Hug, H., M. Enari, and S. Nagata, *No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis.* FEBS Lett, 1994. **351**(3): p. 311-3.

133. Jacobson, M.D., J.F. Burne, and M.C. Raff, *Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus*. *Embo J*, 1994. **13**(8): p. 1899-910.
134. Castedo, M., et al., *Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. *J Immunol*, 1996. **157**(2): p. 512-21.
135. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
136. Dumont, A., et al., *Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB*. *Oncogene*, 1999. **18**(3): p. 747-57.
137. Slater, A.F., et al., *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis*. *Toxicol Lett*, 1995. **82-83**: p. 149-53.
138. Thippeswamy, T. and R. Morris, *Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones*. *Brain Res*, 1997. **774**(1-2): p. 116-22.
139. Adamson, D.C., et al., *Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41*. *Science*, 1996. **274**(5294): p. 1917-21.
140. Albina, J.E. and J.S. Reichner, *Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(1): p. 39-53.
141. Brune, B., et al., *Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(11): p. 7253-8.

142. De Groot, C.J., et al., *Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(1): p. 10-20.
143. Ushmorov, A., et al., *Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2342-52.
144. Umansky, V., et al., *Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis*. J Cell Biochem, 2000. **78**(4): p. 578-87.
145. Maulik, N., et al., *Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II369-75.
146. Saavedra, J.E., et al., *Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver*. J Med Chem, 1997. **40**(13): p. 1947-54.
147. Li, J., et al., *Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(2): p. 419-24.
148. Kim, Y.M., R.V. Talanian, and T.R. Billiar, *Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 31138-48.

149. Hunot, S. and R.A. Flavell, *Death of a monopoly*. Science, 2001. **292**(5518): p. 865-876.
150. Leist, M. and M. Jäätelä, *Triggering of apoptosis by cathepsins*. Cell Death Diff, 2001. **8**: p. 324-326.
151. Johnson, D.E., *Noncaspase proteases in apoptosis*. Leukemia, 2000. **14**(9): p. 1695-1703.
152. Vanags, D.M., et al., *Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis*. J Bio Chem, 1996. **271**(49): p. 31075-31085.
153. Waterhouse, N.J., et al., *Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis*. Cell death Differ, 1998. **5**(12): p. 1051-1061.
154. Yamashima, T., et al., *Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(5): p. 1723-33.
155. Vancompernelle, K., et al., *Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity*. FEBS Lett, 1998. **438**(3): p. 150-8.
156. Roberts, L.R., P.N. Adjei, and G.J. Gores, *Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis*. Cell Biochem Biophys, 1999. **30**(1): p. 71-88.
157. Deiss, L.P., et al., *Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha*. Embo J, 1996. **15**(15): p. 3861-70.
158. Nicholson, D.W., *From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents*. Nature, 2000. **407**: p. 810-816.

159. Vercammen, D., et al., *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 919-930.
160. Kawahara, A., et al., *Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain*. J Cell Biol 1998, 1998. **143**(5): p. 1353-60.
161. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
162. Boise, L.H. and C.M. Collins, *Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?* Trends Microbiol, 2001. **9**: p. 64-67.
163. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Evolutionary lines of cysteine peptidases*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 727-33.
164. Roberg, K., *Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy*. Lab Invest, 2001. **81**(2): p. 149-58.
165. Roberg, K. and K. Ollinger, *Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes*. Am J Pathol, 1998. **152**(5): p. 1151-6.
166. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 999-1010.
167. Roberts, L.R., et al., *Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1714-26.



168. Stoka, V., et al., *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route.* J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3149-57.
169. Gobeil, S., et al., *Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases.* Cell Death Differ, 2001. **8**(6): p. 588-94.
170. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39499-506.
171. Joza, N., et al., *Essential role of mitochondria apoptosis-inducing factor in programmed cell death.* Nature, 2001. **410**: p. 549-554.
172. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.* Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-99.
173. Tortora, G. and N. Anagnostakos, *Principes d'anatomie et de physiologie.* 5th edition ed. 1988, Montréal: Centre Éducatif et Culturel Inc. 888.
174. Iivanainen, E., et al., *Endothelial cell-matrix interactions.* Microsc Res Tech, 2003. **60**(1): p. 13-22.
175. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 609-52.
176. Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani, *Endothelial cell-to-cell junctions.* Faseb J, 1995. **9**(10): p. 910-8.
177. Dejana, E. and A. Del Maschio, *Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium.* Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 309-12.

178. Dejana, E., *Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 1949-53.
179. Dejana, E., A. Zanetti, and A. Del Maschio, *Adhesive proteins at endothelial cell-to-cell junctions and leukocyte extravasation*. Haemostasis, 1996. **26 Suppl 4**: p. 210-9.
180. Schnittler, H.J., *Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium*. Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 3**: p. 30-9.
181. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
182. de Graaf, J.C., et al., *Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions*. Circulation, 1992. **85**(6): p. 2284-90.
183. Pearson, J.D., J.S. Carleton, and J.L. Gordon, *Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture*. Biochem J, 1980. **190**(2): p. 421-9.
184. Esmon, C.T., *Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 946-55.
185. Emeiss, J., *The control of t-PA and PAI release from vessel wall*. Vasc Med Rev, 1995. **6**: p. 153-166.
186. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.

187. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. *Nature*, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
188. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. *J Cell Physiol*, 2003. **196**(3): p. 430-43.
189. Pearson, J.D., *Endothelial cell function and thrombosis*. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 1999. **12**(3): p. 329-41.
190. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets*. *Blood*, 1999. **93**: p. 3831-3848.
191. Greeno, E., R. Bach, and C. Moldow, *Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity*. *Lab Invest*, 1996. **75**: p. 281-9.
192. Casciola-Rosen, L., et al., *Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996. **93**: p. 1624-29.
193. Bombeli, T., et al., *Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant*. *Blood*, 1997. **89**: p. 2429-2442.
194. Zwaal, R. and A. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. *Blood*, 1997. **89**: p. 1121-32.
195. Hébert, M., et al., *Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an IL-1B-dependent paracrine loop*. *Am J Pathol*, 1998. **152**: p. 523-532.

196. Vracko, R., *Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure*. Am J Pathol, 1974. **77**(2): p. 314-46.
197. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
198. Aumailley, M. and R. Timpl, *Attachment of cells to basement membrane collagen type IV*. J Cell Biol, 1986. **103**(4): p. 1569-75.
199. Paulsson, M., *Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1992. **27**(1-2): p. 93-127.
200. Yurchenco, P.D., et al., *Models for the self-assembly of basement membrane*. J Histochem Cytochem, 1986. **34**(1): p. 93-102.
201. Yurchenco, P.D. and G.C. Ruben, *Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2559-68.
202. Yurchenco, P.D., S. Smirnov, and T. Mathus, *Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins*. Methods Cell Biol, 2002. **69**: p. 111-44.
203. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 423-8.
204. Ortega, N. and Z. Werb, *New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 22): p. 4201-14.
205. Tomono, Y., et al., *Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes*. Cell Struct Funct, 2002. **27**(1): p. 9-20.

206. Ramchandran, R., et al., *Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **255**(3): p. 735-9.
207. Timpl, R., et al., *A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes*. *Eur J Biochem*, 1981. **120**(2): p. 203-11.
208. Kuhn, K., et al., *Macromolecular structure of basement membrane collagens*. *FEBS Lett*, 1981. **125**(1): p. 123-8.
209. Aumailley, M., et al., *Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies*. *J Cell Sci*, 2000. **113 Pt 2**: p. 259-68.
210. Sasaki, T., et al., *Deficiency of beta 1 integrins in teratoma interferes with basement membrane assembly and laminin-1 expression*. *Exp Cell Res*, 1998. **238**(1): p. 70-81.
211. Utani, A., et al., *A specific sequence of the laminin alpha 2 chain critical for the initiation of heterotrimer assembly*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(7): p. 3292-8.
212. Aumailley, M. and N. Smyth, *The role of laminins in basement membrane function*. *J Anat*, 1998. **193 ( Pt 1)**: p. 1-21.
213. Mayer, U., E. Kohfeldt, and R. Timpl, *Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **857**: p. 130-42.
214. Timpl, R. and J.C. Brown, *Supramolecular assembly of basement membranes*. *Bioessays*, 1996. **18**(2): p. 123-32.
215. Fox, J.W., et al., *Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV*. *Embo J*, 1991. **10**(11): p. 3137-46.

216. Ruoslahti, E., *Structure and biology of proteoglycans*. Annu Rev Cell Biol, 1988. 4: p. 229-55.
217. Kallunki, P. and K. Tryggvason, *Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules and epidermal growth factor*. J Cell Bio, 1992. 116: p. 559-571.
218. Iozzo, R.V. and A.D. Murdoch, *Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function*. Faseb J, 1996. 10(5): p. 598-614.
219. Iozzo, R.V., *Perlecan: a gem of a proteoglycan*. Matrix Biol, 1994. 14(3): p. 203-8.
220. Iozzo, R.V., et al., *The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices*. Biochem J, 1994. 302 ( Pt 3): p. 625-39.
221. Murdoch, A.D. and R.V. Iozzo, *Perlecan: the multidomain heparan sulphate proteoglycan of basement membrane and extracellular matrix*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. 423(4): p. 237-42.
222. Friedrich, M.V., et al., *Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V*. J Mol Biol, 1999. 294(1): p. 259-70.
223. Murdoch, A.D., et al., *Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein*

- receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor.* J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8544-57.
224. Kokenyesi, R. and J.E. Silbert, *Formation of heparan sulfate or chondroitin/dermatan sulfate on recombinant domain I of mouse perlecan expressed in Chinese hamster ovary cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(1): p. 262-7.
225. Groffen, A.J., et al., *Expression and characterization of human perlecan domains I and II synthesized by baculovirus-infected insect cells.* Eur J Biochem, 1996. **241**(3): p. 827-34.
226. Dolan, M., et al., *Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis.* J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4316-22.
227. Costell, M., et al., *Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycans and oligosaccharides.* Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 115-21.
228. Bork, P. and L. Patthy, *The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation.* Protein Sci, 1995. **4**(7): p. 1421-5.
229. Costell, M., et al., *Structural characterization of recombinant domain II of the basement membrane proteoglycan perlecan.* FEBS Lett, 1996. **396**(2-3): p. 127-31.
230. Timpl, R. and J.C. Brown, *The laminins.* Matrix Biol, 1994. **14**(4): p. 275-81.
231. Schulze, B., et al., *Structural properties of recombinant domain III-3 of perlecan containing a globular domain inserted into an epidermal-growth-factor-like motif.* Eur J Biochem, 1995. **231**(3): p. 551-6.

232. Schulze, B., et al., *Structural and cell-adhesive properties of three recombinant fragments derived from perlecan domain III*. *Matrix Biol*, 1996. **15**(5): p. 349-57.
233. Hunter, D.D., et al., *Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin*. *Cell*, 1989. **59**(5): p. 905-13.
234. Timpl, R., *Proteoglycans of basement membranes*. *Experientia*, 1993. **49**(5): p. 417-28.
235. Campbell, G.R. and J.H. Campbell, *The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma*. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. **598**: p. 143-58.
236. Sjolund, M., et al., *Expression of PDGF alpha- and beta-receptors in rat arterial smooth muscle cells is phenotype and growth state dependent*. *Growth Factors*, 1990. **3**(3): p. 191-203.
237. Rivard, A. and V. Andres, *Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases*. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(2): p. 557-71.
238. Thyberg, J., *Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury*. *Histol Histopathol*, 1998. **13**(3): p. 871-91.
239. Stemerman, M.B., et al., *Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(12): p. 3863-6.
240. Clowes, A.W., M.A. Reidy, and M.M. Clowes, *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium*. *Lab Invest*, 1983. **49**(3): p. 327-33.



241. Clowes, A.W. and S.M. Schwartz, *Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery*. *Circ Res*, 1985. **56**(1): p. 139-45.
242. Majesky, M.W., et al., *Heparin regulates smooth muscle S phase entry in the injured rat carotid artery*. *Circ Res*, 1987. **61**(2): p. 296-300.
243. Hanke, H., et al., *Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty*. *Circ Res*, 1990. **67**(3): p. 651-9.
244. Ohno, T., et al., *Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury*. *Science*, 1994. **265**(5173): p. 781-4.
245. Stadius, M.L., et al., *Time course and cellular characteristics of the iliac artery response to acute balloon injury. An angiographic, morphometric, and immunocytochemical analysis in the cholesterol-fed New Zealand white rabbit*. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(11): p. 1267-73.
246. Geary, R.L., et al., *Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(1): p. 34-43.
247. Majack, R.A., *Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(1): p. 465-71.
248. Majesky, M.W., E.P. Benditt, and S.M. Schwartz, *Expression and developmental control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/Sis genes in rat aortic smooth muscle cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(5): p. 1524-8.

249. Banskota, N.K., et al., *Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(8): p. 1183-90.
250. Raines, E.W., S.K. Dower, and R. Ross, *Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA*. Science, 1989. **243**(4889): p. 393-6.
251. Majack, R.A., M.W. Majesky, and L.V. Goodman, *Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta*. J Cell Biol, 1990. **111**(1): p. 239-47.
252. Thyberg, J., et al., *Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(6): p. 966-90.
253. Hultgardh-Nilsson, A., et al., *Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries*. Differentiation, 1991. **47**(2): p. 99-105.
254. Salhany, K.E., et al., *Differential induction of the c-fos promoter through distinct PDGF receptor-mediated signaling pathways*. J Cell Physiol, 1992. **150**(2): p. 386-95.
255. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**: p. 801-809.
256. Wolf, Y.G., L.M. Rasmussen, and E. Ruoslahti, *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1172-8.

257. Kanzaki, T., et al., *In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 1951-7.
258. Ferns, G.A., et al., *Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.* Science, 1991. **253**(5024): p. 1129-32.
259. Lindner, V. and M.A. Reidy, *Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3739-43.
260. Nabel, E.G., et al., *Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo.* J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1822-9.
261. Nabel, E.G., et al., *Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 844-6.
262. Wilson, E., et al., *Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF.* J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 741-7.
263. Hishikawa, K., et al., *Pressure promotes DNA synthesis in rat cultured vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1975-80.
264. Calara, F., et al., *Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(2): p. 187-93.

265. Cheng, G.C., et al., *Induction of DNA synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells. Role of fibroblast growth factor-2.* *Circulation*, 1996. **93**(1): p. 99-105.
266. Mills, I., et al., *Strain activation of bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: study of strain dependency and the role of protein kinase A and C signaling pathways.* *J Cell Physiol*, 1997. **170**(3): p. 228-34.
267. Lai, K., et al., *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat arterial smooth muscle cell proliferation.* *J Clin Invest*, 1996. **98**(7): p. 1560-7.
268. Hu, Y., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2808-16.
269. Wei, G.L., et al., *Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty.* *Circ Res*, 1997. **80**(3): p. 418-26.
270. Nava, E., G. Noll, and T.F. Luscher, *Nitric oxide in cardiovascular diseases.* *Ann Med*, 1995. **27**(3): p. 343-51.
271. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.* *Pharmacol Rev*, 1991. **43**(2): p. 109-42.
272. Moroi, M., et al., *Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice.* *J Clin Invest*, 1998. **101**(6): p. 1225-32.
273. Rudic, R.D., et al., *Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling.* *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 731-6.

274. Van Belle, E., et al., *Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **235**(2): p. 311-6.
275. Asahara, T., et al., *Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery*. *Circulation*, 1995. **91**(11): p. 2793-801.
276. Bjornsson, T.D., et al., *Acidic fibroblast growth factor promotes vascular repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8651-5.
277. McNamara, D.B., et al., *L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **193**(1): p. 291-6.
278. Hamon, M., et al., *Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury*. *Circulation*, 1994. **90**(3): p. 1357-62.
279. Schwarzacher, S.P., et al., *Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty*. *Circulation*, 1997. **95**(7): p. 1863-9.
280. Le Tourneau, T., et al., *Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **33**(3): p. 876-82.
281. von der Leyen, H.E., et al., *Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(4): p. 1137-41.

282. Shears, L.L., et al., *Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2035-42.
283. Chen, L., et al., *Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and in balloon-injured carotid artery*. Circ Res, 1998. **82**(8): p. 862-70.
284. Janssens, S., et al., *Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats*. Circulation, 1998. **97**(13): p. 1274-81.
285. Varenne, O., et al., *Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs*. Circulation, 1998. **98**(9): p. 919-26.
286. Yang, Z.Y., et al., *Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7905-10.
287. Ueno, H., et al., *Adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor-p21 suppresses neointimal formation in the balloon-injured rat carotid arteries in vivo*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 401-11.
288. Chang, M.W., et al., *Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2260-8.
289. Chen, D., et al., *Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an*

- inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2334-41.
290. Ishida, A., et al., *Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 10050-7.
291. Guo, K., V. Andres, and K. Walsh, *Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 1998. **97**(20): p. 2066-72.
292. Schwartz, S.M. and C.E. Murry, *Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 437-60.
293. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**: p. 115-126.
294. Benditt, E.P. and J.M. Benditt, *Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(6): p. 1753-6.
295. Pearson, T.A., et al., *Monoclonal characteristics of organising arterial thrombi: Significance in the origin and growth of human atherosclerotic plaques*. Lancet, 1979. **1**(8106): p. 7-11.
296. Pearson, T.A., et al., *Clonal characteristics of experimentally induced "atherosclerotic" lesions in the hybrid hare*. Science, 1979. **206**(4425): p. 1423-5.
297. Thomas, W.A., et al., *Population dynamics of arterial cells during atherogenesis. X. Study of monotypism in atherosclerotic lesions of black women heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD)*. Exp Mol Pathol, 1979. **31**(3): p. 367-86.

298. Murry, C.E., et al., *Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 697-705.
299. Frid, M.G., et al., *Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities*. Circ Res, 1997. **81**(6): p. 940-52.
300. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**: p. 233-241.
301. Yokote, K., et al., *Bone marrow-derived vascular cells in response to injury*. J Atheroscler Thromb, 2003. **10**(4): p. 205-10.
302. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
303. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
304. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
305. Eriksson, U. and K. Alitalo, *Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 41-57.
306. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 97-132.
307. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 1-30.
308. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.



309. Thurston, G., et al., *Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2511-4.
310. Zagzag, D., et al., *In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis*. Exp Neurol, 1999. **159**(2): p. 391-400.
311. Stratmann, A., W. Risau, and K.H. Plate, *Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1459-66.
312. Goede, V., et al., *Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis*. Lab Invest, 1998. **78**(11): p. 1385-94.
313. Holash, J., et al., *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1994-8.
314. Holash, J., S.J. Wiegand, and G.D. Yancopoulos, *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5356-62.
315. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
316. Pepper, M.S., *Extracellular proteolysis and angiogenesis*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 346-55.
317. Jackson, C., *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(3): p. 295-9.
318. Lutun, A., et al., *The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies*. Curr Atheroscler Rep, 2000. **2**(5): p. 407-16.

319. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 653-60.
320. Bajou, K., et al., *Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization*. Nat Med, 1998. 4(8): p. 923-8.
321. Richardson, T.P., et al., *Polymeric system for dual growth factor delivery*. Nat Biotechnol, 2001. 19(11): p. 1029-34.
322. Gerety, S.S., et al., *Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development*. Mol Cell, 1999. 4(3): p. 403-14.
323. Wang, H.U., Z.F. Chen, and D.J. Anderson, *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4*. Cell, 1998. 93(5): p. 741-53.
324. Adams, R.H., et al., *Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis*. Genes Dev, 1999. 13(3): p. 295-306.
325. Leung, L.L., *Overview of hemostasis*, UpToDate, 2003, 02-11, 2004, 2003-05-05
326. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2002. 1(4): p. 273-88.
327. Kojima, H., et al., *Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome*. J Clin Invest, 1994. 94(6): p. 2237-44.

328. Rapaport, S.I. and L.V. Rao, *The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina"*. Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 7-17.
329. Kohler, H.P. and P.J. Grant, *Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(24): p. 1792-801.
330. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. **180**(93): p. 1332-9.
331. Escargueil-Blanc, I., et al., *Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(2): p. 331-339.
332. Dimmeler, S., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis*. Circulation, 1997. **95**(7): p. 1760-1763.
333. Harada-Shiba, M., et al., *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9681-9687.
334. Du, X., et al., *Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species*. Diabetologia, 1998. **41**(3): p. 249-256.
335. Sata, M. and K. Walsh, *Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1682-1689.

336. Cybulsky, M., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **107**: p. 1255-1262.
337. Cotran, R. and T. Mayadas-Norton, *Endothelial adhesion molecules in health and disease*. Pathol Biol, 1998. **46**: p. 164-170.
338. Collins, R., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**: p. 189-194.
339. Bourdillon, M., et al., *ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-)/ICAM-1(-)) fed a fat or a chow diet*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**: p. 2630-2635.
340. Dansky, H.M., et al., *Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(10): p. 1662-7.
341. Weiss, N., et al., *Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state--impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(11): p. 1455-61.
342. Eberhardt, R.T., et al., *Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 483-91.
343. Lang, D., et al., *Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 422-7.
344. Zhang, F., et al., *Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine*. Am J Physiol, 1998. **274**(6 Pt 2): p. R1704-11.

345. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
346. Li, D., B. Yang, and J. Mehta, *Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas*. Am J Physiol, 1998. **275**: p. H568-H576.
347. Baumgartner-Parzer, S.L., et al., *High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells*. Diabetes, 1995. **44**: p. 1323-1327.
348. Tithof, P., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism*. FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1463-4.
349. Wang, J., D. Wilcken, and X. Wang, *Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells*. Mol Genet Metab, 2001. **72**(1): p. 82-8.
350. Pollman, M., et al., *Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease*. Nat Med, 1998. **4**(2): p. 222-227.
351. Diez, J., et al., *Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats*. Eur Heart J, 1998. **Suppl G**: p. G29-G33.
352. Malik, N., et al., *Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty*. Circulation, 1998. **98**(16): p. 1657-1665.
353. Sata, M., et al., *Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1213-1217.

354. Guevara, N., et al., *The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo*. Nat Med, 1999. **5**: p. 335-339.
355. Rembold, C., *Could atherosclerosis originate from defective smooth muscle cell death (apoptosis)*. Persperct Biol Med, 1996. **39**: p. 405-408.
356. Bochaton-Piallat, M., et al., *Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening*. Am J Pathol, 1995. **146(5)**: p. 1059-1064.
357. Suzuki, J., et al., *Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts*. Cardiovascular Res, 2000. **45**: p. 783-787.
358. Pollman, M.J., J.L. Hall, and G.H. Gibbons, *Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype*. Circ Res, 1999. **84(1)**: p. 113-121.
359. Suzuki, J., et al., *Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation*. Circulation, 2002. **106**: p. 847-853.
360. George, S., et al., *Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis*. Gene Ther, 2001. **8**: p. 668-76.
361. Anderson, P., *Kinase cascades regulating entry into apoptosis*. Microbio Mol Biol Rev, 1997. **61**: p. 33-46.
362. Hu, Y., et al., *Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**: p. 18-26.

363. Rodriguez-Campos, A., et al., *Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**: p. 214-9.
364. Faggiotto, A., R. Ross, and L. Harker, *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(4): p. 323-40.
365. Faggiotto, A. and R. Ross, *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(4): p. 341-56.
366. Masuda, J. and R. Ross, *Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque*. *Arteriosclerosis*, 1990. **10**(2): p. 178-87.
367. Masuda, J. and R. Ross, *Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation*. *Arteriosclerosis*, 1990. **10**(2): p. 164-77.
368. Rosenfeld, M.E., et al., *Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits*. *Arteriosclerosis*, 1987. **7**(1): p. 9-23.
369. Rosenfeld, M.E., et al., *Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits*. *Arteriosclerosis*, 1987. **7**(1): p. 24-34.
370. Mora, R., F. Lupu, and N. Simionescu, *Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular*

- phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. Atherosclerosis*, 1987. **67**(2-3): p. 143-54.
371. Thomas, W.A., K.T. Lee, and D.N. Kim, *Cell population kinetics in atherogenesis. Cell births and losses in intimal cell mass-derived lesions in the abdominal aorta of swine. Ann N Y Acad Sci*, 1985. **454**: p. 305-15.
372. Tsukada, T., et al., *Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. Arteriosclerosis*, 1986. **6**(6): p. 601-13.
373. Sirois, M.G., M. Simons, and E.R. Edelman, *Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR-beta receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. Circulation*, 1997. **95**(3): p. 669-76.
374. Laukkanen, J. and S. Yla-Herttuala, *Genes involved in atherosclerosis. Exp Nephrol*, 2002. **10**(2): p. 150-63.
375. Masri, C., et al., *Soluble Fas and soluble Fas-ligand in children with Escherichi coli O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Am J Kidney Dis*, 2000. **36**: p. 687-694.
376. Huseman, D., et al., *Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow. Pediatr Nephrol*, 1999. **13**: p. 672-7.
377. Busca, A. and C. Uderzo, *BMT: Bone Marrow Transplant Associated Thrombotic Microangiopathy. Hematol*, 2000. **5**(1): p. 53-67.
378. Franz, M., et al., *Posttransplant hemolytic uremic syndrome in adult retransplanted kidney graft recipients: advantage of FK506 therapy? Transplantation*, 1998. **66**: p. 1258-62.



379. Hébert, M.J., et al., *Mesangiolysis associated with bone marrow transplantation: new insights on possible etiogenic factors*. Am J Kidney Dis, 1994. **23**: p. 882-3.
380. Agarwal, A., et al., *Recurrent hemolytic uremic syndrome in an adult renal allograft recipient: current concepts and management*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**: p. 1160-9.
381. Zager, R., *Acute renal failure in the setting of bone marrow transplantation*. Kidney Int, 1994. **46**: p. 1443-58.
382. George, J., *How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2000. **96**: p. 1223-9.
383. Laurence, J. and D. Mitra, *Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura/sporadic hemolytic uremic syndrome*. Seminars in Hematology, 1997. **34**: p. 98-105.
384. Mitra, D., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells*. Blood, 1997. **89**: p. 1224-34.
385. Morel-Maroger, L., et al., *Prognostic importance of vascular lesions in acute renal failure with microangiopathic hemolytic anemia (hemolytic-uremic syndrome): clinicopathologic study in 20 adults*. Kidney Int, 1979. **15**: p. 548-58.
386. Renaud, C., et al., *Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(1): p. 24-9.

387. Matsumae, T., S. Takebayashi, and S. Naito, *The clinico-pathological characteristics and outcome in hemolytic-uremic syndrome of adults*. Clin Nephrol, 1996. **45**: p. 153-62.
388. Gagnadoux, M.F., et al., *Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome*. Clin Nephrol, 1996. **46**: p. 39-41.
389. Lian, E., *Thrombotic thrombocytopenic purpura--a syndrome caused by multiple pathogenetic mechanisms*. Invest Clin, 2001. **42**: p. 75-86.
390. Kakishita, E., *Pathophysiology and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome (TTP/HUS)*. Int J Hematol, 2000. **71**: p. 320-327.
391. Teloo, D.M., et al., *Detection of apoptosis in kidney biopsied of patients with D+ hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2001. **49**: p. 413-6.
392. Arends, M. and D. Harrison, *Novel histopathologic findings in a surviving case of hemolytic uremic syndrome after bone marrow transplantation*. Hum Pathol, 1989. **20**: p. 89-91.
393. Esposito, C., et al., *Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial, and fibroblast cell cultures*. Kidney Int, 2000. **58**: p. 123-130.
394. Kochi, S., et al., *Induction of apoptosis in mouse brain capillary endothelial cells by cyclosporin A and tacrolimus*. Life Sci, 2000. **66**: p. 2255-2260.
395. Molostvov, G., et al., *Interaction of cytokines and growth factors in the regulation of verotoxin-induced apoptosis in cultured human endothelial cells*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 891-897.

396. Pijpers, A., et al., *Verocytotoxin-induced apoptosis of human microvascular endothelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**: p. 767-78.
397. Shimizu, A., et al., *Acute humoral xenograft rejection: destruction of the microvascular capillary endothelium in pig-to-nonhuman primate renal grafts*. Lab Invest, 2000. **80**: p. 815-830.
398. Nangaku, M., et al., *Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9*. Kidney Int, 1997. **52**: p. 1570-8.
399. Hughes, J., et al., *C5b-9 membrane attack complex mediates endothelial cell apoptosis in experimental glomerulonephritis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(5): p. F747-F757.
400. Habib, R., H. Mathieu, and P. Royer, *Le syndrome hémolytique urémique de l'enfant*. Nephron, 1967. **4**: p. 139-72.
401. Habib, R., et al., *Etude anatomo-pathologique de 35 observations de syndrome hémolytique et urémique de l'enfant*. Arch Fr Pediatr, 1969. **26**: p. 391-401.
402. Gervais, M., et al., *Immunofluorescent and histologic findings in the hemolytic uremic syndrome*. Pediatrics, 1971. **47**: p. 352-9.
403. Pisone, R. and G. Remuzzi, *Thrombotic microangiopathy*. Eur J Intern Med, 2000. **3**: p. 135-139.
404. Remuzzi, G. and P. Ruggenti, *The hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1995. **47**: p. 2-19.
405. Vitsky, B., et al., *The hemolytic-uremic syndrome: A study of renal pathologic alterations*. Am J Pathol, 1969. **57**: p. 627-47.

406. Fitzpatrick, M., et al., *Long term renal outcome of childhood haemolytic uraemic syndrome*. Br Med J, 1991. **303**: p. 489-92.
407. Shulman, H., et al., *Nephrotoxicity of cyclosporin A after allogenic marrow transplantation: glomerular thromboses and tubular injury*. N Engl J Med, 1981. **305**(23): p. 1392-1395.
408. Tarbell, N., et al., *Late onset renal dysfunction in survivors of bone marrow transplantation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1988. **15**: p. 99-104.
409. Rabinowe, S., et al., *Hemolytic-uremic syndrome following bone marrow transplantation in adults for hematologic malignancies*. Blood, 1991. **77**: p. 1837-44.
410. Leblond, V., et al., *Evaluation of renal function in 60 long-term survivors of bone marrow transplantation*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**: p. 1661-5.
411. Juckett, M., et al., *Hemolytic uremic syndrome following bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transpl, 1991. **7**(5): p. 405-409.
412. Cohen, E., et al., *Clinical course of late-onset bone marrow transplant nephropathy*. Nephron, 1993. **64**: p. 626-35.
413. Lawton, C., et al., *Late renal dysfunction in adult survivors of bone marrow transplantation*. Cancer, 1991. **67**: p. 2795-2800.
414. Ruggenti, P. and G. Remuzzi, *Thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders*. Hematol/Oncol Clinics North Am, 1990. **4**: p. 219-33.
415. Holländer, G., B. Bierer, and S. Burakoff, *Molecular mechanisms of immunosuppressive drugs : cyclosporin A, FK506, and rapamycin, in TRANSPLANTATION BIOLOGY : Cellular and molecular aspects*, N. Tilney,

- T. Strom, and L. Paul, Editors. 1996, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 657-671.
416. Borel, J.F., *The cyclosporins*. Transplant Proc, 1989. **21**(1 Pt 1): p. 810-5.
417. Kronke, M., et al., *Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(16): p. 5214-8.
418. Herold, K.C., et al., *Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells*. J Immunol, 1986. **136**(4): p. 1315-21.
419. Granelli-Piperno, A., *In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A*. J Exp Med, 1988. **168**(5): p. 1649-58.
420. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
421. Schreiber, S.L., *Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands*. Science, 1991. **251**(4991): p. 283-7.
422. Schmid, F.X., *Protein folding. Prolyl isomerases join the fold*. Curr Biol, 1995. **5**(9): p. 993-4.
423. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
424. Shenolikar, S., *Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 55-86.
425. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 453-508.

426. Klee, C.B., G.F. Draetta, and M.J. Hubbard, *Calcineurin*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1988. **61**: p. 149-200.
427. Matsuda, S. and S. Koyasu, *Mechanisms of action of cyclosporine*. *Immunopharmacology*, 2000. **47**(2-3): p. 119-25.
428. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. *Nature*, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
429. Loh, C., et al., *T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(7): p. 3945-54.
430. Northrop, J.P., et al., *NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation*. *Nature*, 1994. **369**(6480): p. 497-502.
431. Shaw, K.T., et al., *Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(24): p. 11205-9.
432. Timmerman, L.A., et al., *Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 837-40.
433. Walter, D.H., et al., *Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria*. *Circulation*, 1998. **98**: p. 1153-1157.
434. Liu, J., et al., *Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity*. *Biochemistry*, 1992. **31**(16): p. 3896-901.
435. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. *Biochem J*, 1999. **341** ( Pt 2): p. 233-49.

436. Pyrzynska, B., G. Mosieniak, and B. Kaminska, *Changes of the trans-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alterations of AP-1 composition*. J Neurochem, 2000. **74**(1): p. 42-51.
437. Mosieniak, G., I. Figiel, and B. Kaminska, *Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor*. J Neurochem, 1997. **68**(3): p. 1142-9.
438. Longoni, B., et al., *Apoptosis and adaptive responses to oxidative stress in human endothelial cells exposed to cyclosporin A correlate with BCL-2 expression levels*. FASEB J, 2001. **15**: p. 731-740.
439. Navarro-Antolin, J., et al., *Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells expose to cyclosporine A*. FASEB J, 2001. **15**: p. 1291-1293.
440. Giroux, L., et al., *Hemolytic uremic syndrome in renal allografted patients treated with cyclosporin*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(6): p. 1125-31.
441. Buturovic, J., et al., *Cyclosporine-associated hemolytic uremic syndrome in four renal allograft recipients: resolution without specific therapy*. Transplant Proc, 1990. **22**(4): p. 1726-7.
442. Epstein, M. and D. Landsberg, *Cyclosporine-induced thrombotic microangiopathy resulting in renal allograft loss and its successful reuse: a report of two cases*. Am J Kidney Dis, 1991. **17**(3): p. 346-8.
443. Young, B.A., et al., *Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome following kidney and kidney-pancreas transplantation*. Am J Kidney Dis, 1996. **28**(4): p. 561-71.

444. Miller, B.W., et al., *Cyclosporine as cause of thrombotic microangiopathy after renal transplantation*. Am J Kidney Dis, 1997. **29**(5): p. 813-4.
445. Zarifian, A., et al., *Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy in renal allografts*. Kidney Int, 1999. **55**(6): p. 2457-66.
446. Burke, G.A., M.E. McGraw, and A.G. MacIver, *The role of early renal biopsy in cyclosporin induced thrombotic microangiopathy*. Pediatr Nephrol, 1999. **13**(7): p. 564-6.
447. Katafuchi, R., et al., *A case of late onset cyclosporine-induced hemolytic uremic syndrome resulting in renal graft loss*. Clin Transplant, 1999. **13** Suppl 1: p. 54-8.
448. Zent, R., et al., *Thrombotic microangiopathy in renal transplant recipients treated with cyclosporin A*. Clin Nephrol, 1997. **47**(3): p. 181-6.
449. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine*. Am J Kidney Dis, 1989. **13**(4): p. 261-72.
450. de Mattos, A.M., A.J. Olyaei, and W.M. Bennett, *Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Long-term consequences and challenges for the future*. Am J Kidney Dis, 2002. **35**: p. 333.
451. Sayegh, M. and W. Bennett, *Cyclosporine and tacrolimus (FK506) nephrotoxicity*, UpToDate, 2003, **02-06, 2004**, 2003-09-08
452. Mihatsch, M.J., G. Thiel, and B. Ryffel, *Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity*. Transplant Proc, 1988. **20**(3 Suppl 3): p. 759-71.
453. Kopp, J.B. and P.E. Klotman, *Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity*. J Am Soc Nephrol, 1990. **1**(2): p. 162-79.



454. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. *Circulation*, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
455. Pohlman, T.H. and J.M. Harlan, *Adaptative responses of the endothelium to stress*. *J Surg Res*, 2000. **89**(1): p. 85-119.
456. Tomai, F., et al., *Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance*. *Circulation*, 1999. **100**(5): p. 559-63.
457. Baines, C.P., J.M. Pass, and P. Ping, *Protein kinases and kinase-modulated effectors in the latephase of ischemic preconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2001. **96**(3): p. 207-218.
458. Rubino, A. and D.M. Yellon, *Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart*. *Trends Pharmacol Sci*, 2000. **21**(6): p. 1571-1574.
459. Totsuka, E., et al., *Hepatology*, 2000. **31**: p. 577.
460. Tomai, F., et al., *Effects of A1 adenosine receptor blockade by bamiphylline on ischaemic preconditioning during coronary angioplasty*. *Eur Heart J*, 1996. **17**(6): p. 846-53.
461. Claeys, M.J., et al., *Aminophylline inhibits adaptation to ischaemia during angioplasty. Role of adenosine in ischaemic preconditioning*. *Eur Heart J*, 1996. **17**(4): p. 539-44.
462. Schaefer, S., et al., *Blockade of adenosine receptors with aminophylline limits ischemic preconditioning in human beings*. *Am Heart J*, 2001. **142**(3): p. E4.

463. Schultz, J.E., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart*. *Circ Res*, 1996. **78**(6): p. 1100-4.
464. Andoh, T., S.Y. Lee, and C.C. Chiueh, *Preconditioning regulation of bcl-2 and p66shc by human NOS1 enhances tolerance to oxidative stress*. *Faseb J*, 2000. **14**(14): p. 2144-6.
465. Ping, P. and E. Murphy, *Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase?* *Circ Res*, 2000. **86**(9): p. 921-2.
466. Dana, A., et al., *Adenosine A(1) receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism*. *Circ Res*, 2000. **86**(9): p. 989-97.
467. Bolli, R., et al., *The nitric oxide hypothesis of late preconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 1998. **93**(5): p. 325-38.
468. Baxter, G.F., F.M. Goma, and D.M. Yellon, *Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium*. *Br J Pharmacol*, 1995. **115**(2): p. 222-4.
469. Ping, P., et al., *Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity*. *Circ Res*, 1997. **81**(3): p. 404-14.

470. Wilson, S., et al., *Delayed cardioprotection is associated with the sub-cellular relocalisation of ventricular protein kinase C epsilon, but not p42/44MAPK.* Mol Cell Biochem, 1996. **160-161**: p. 225-30.
471. Tong, H., et al., *Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C.* Circ Res, 2000. **87**(4): p. 309-15.
472. Kawamura, S., et al., *Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon, which mediate functional protection in isolated rat heart.* Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. H2266-71.
473. Sugden, P.H. and A. Clerk, *"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium.* Circ Res, 1998. **83**(4): p. 345-52.
474. Ping, P., et al., *PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits.* Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1468-81.
475. Ping, P., et al., *PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits.* Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H1771-85.
476. Yamashita, N., et al., *Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning.* J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2193-9.
477. Dana, A., et al., *Adenosine A(1) receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase.* Circulation, 2000. **101**(24): p. 2841-8.

478. Yamashita, N., et al., *A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart.* J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(6): p. 1181-9.
479. Chen, Z., et al., *Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice.* J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(11): p. 2281-9.
480. Vaux, D.L., G. Haeccker, and A. Strasser, *An evolutionary perspective on apoptosis.* Cell, 1994. **76**(5): p. 777-9.
481. Verweij, J., A. Sparreboom, and K. Nooter, *Mitomycins.* Cancer Chemother Biol Response Modif, 1999. **18**: p. 46-58.
482. Armstrong, V.W. and M. Oellerich, *New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine.* Clin Biochem, 2001. **34**: p. 9-16.
483. Kung, L. and P.F. Halloran, *Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations.* Transplantation, 2000. **70**: p. 327-335.
484. Marchetti, P., et al., *Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.* J Exp Med, 1996. **184**: p. 1155-1160.
485. Kagedal, K., U. Johansson, and K. Öllinger, *The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress.* FASEB J, 2001. **15**: p. 1592-1594.
486. Fortin, M., et al., *Increased risk of thrombotic microangiopathy in patient receiving a cyclosporin-sirolimus combination.* J Am Soc Transpl, 2004. **4**(6): p. 946-952.

487. Nakano, A., M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications*. Pharmacol Ther, 2000. **86**(3): p. 263-75.
488. Omura, S., et al., *A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization*. J Antibiot (Tokyo), 1977. **30**(4): p. 275-82.
489. Hoffman, R. and E.S. Newlands, *Role of protein kinase C in adriamycin-induced erythroid differentiation of K562 cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 1991. **28**(2): p. 102-4.
490. Bartram, U. and C.P. Speer, *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease*. Chest, 2004. **125**(2): p. 754-65.
491. Sigmund, C.D., *Genetic manipulation of the renin-angiotensin system: targeted expression of the renin-angiotensin system in the kidney*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 33S-37S.
492. Ganong, W.F., *Origin of the angiotensin II secreted by cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1994. **205**(3): p. 213-9.
493. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, *Adhesion molecules and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 191-203.
494. Blann, A.D., S.K. Nadar, and G.Y. Lip, *The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2003. **24**(24): p. 2166-79.
495. Li, Y.F., et al., *Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. II. Expression of chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans reactive with L-selectin*. FEBS Lett, 1999. **444**(2-3): p. 201-5.

496. Kawashima, H., et al., *Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin*. *Int Immunol*, 1999. **11**(3): p. 393-405.
497. Kawashima, H., et al., *Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35448-56.
498. Kawashima, H., et al., *Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(15): p. 12921-30.
499. Kinbara, K., et al., *Ras GTPases: integrins' friends or foes?* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(10): p. 767-76.
500. Reginato, M.J., et al., *Integrins and EGFR coordinately regulate the proapoptotic protein Bim to prevent anoikis*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(8): p. 733-40.
501. Bernard, K.R., et al., *Methods in Functional Proteomics: Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis With Immobilized pH Gradients In-Gel Digestion and Identification of Proteins by Mass Spectrometry*. *Methods Mol Biol*, 2004. **250**: p. 263-82.

